

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

POSSIBLE RÔLE DU MIF DANS L'ACTIVATION POLYCLONALE
NON SPÉCIFIQUE DES CELLULES B PENDANT L'INFECTION PAR
Plasmodium chabaudi adami DK

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
JORGE LUIS CUEVA VARGAS

MARS 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dre Tatiana Scorza pour m'avoir accueilli, accepté et supporté pendant la réalisation de ma maîtrise ; pour m'avoir donné le goût de faire et de continuer en la recherche.

J'aimerais également remercier mes collègues du laboratoire, Mathieu Cambos, Stéphanie Bazinet et Benoît Bélanger pour leurs encouragements et soutien moral pendant le développement de mon projet.

No quisiera dejar de mencionar a mis padres, Aurea y Eudomaro, y a mi hermano José Alberto, quienes siempre están presentes para brindarme todo tipo de apoyo, gracias a ellos estoy cumpliendo con mis anhelos.

Finalmente quisiera también agradecer a mi esposa Heidy, quien con su dulzura y paciencia me acompaña y me apoya en esta aventura.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
RÉSUMÉ	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DE CONNAISSANCES.....	4
1.1 La Malaria.....	4
1.2 Le cycle de vie du parasite.....	5
1.3 Manifestations cliniques.....	6
1.4 Le traitement.....	9
1.5 L'immunologie de <i>Plasmodium</i>	9
1.5.1 L'immunité naturellement acquise.....	10
1.5.2 L'immunité contre les sporozoïtes.....	11
1.5.3 L'immunité contre des antigènes exo érythrocytaires.....	12
1.5.4 L'immunité contre la phase érythrocytaire	12
1.6 L'immunosuppression induite par <i>Plasmodium</i>	13
1.6.1 La suppression de la réponse humorale.....	14
1.6.2 Mécanismes de l'immunosuppression pendant les infections par <i>Plasmodium</i>	15
1.7 L'activation des cellules B et la réponse sérologique.....	17
1.7.1 Les antigènes thymus dépendent.....	17
1.7.2 Les antigènes thymus indépendant.	19
1.8 Mécanismes d'apoptose chez les cellules B pendant les infections par <i>Plasmodium</i>	21
1.9 L'activation polyclonale des cellules B pendant les infections par <i>Plasmodium</i>	21

1.10	Le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF).....	23
1.10.1	Le MIF et l'immunité innée.....	24
1.10.2	Le MIF et l'anémie pendant les infections par <i>Plasmodium</i>	24
1.10.3	L'activité enzymatique du MIF.....	25
1.10.4	Le mécanisme d'action du MIF.....	26
1.11	Objectifs.....	28
CHAPITRE II		
	DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE.....	30
2.1	Les souris.....	30
2.2	Les infections des souris.....	30
2.3	Immunisations, effets de l'infection et de la neutralisation du MIF « <i>in vivo</i> ».....	30
2.4	Purification des cellules B et mesure de leur activité métabolique et prolifération suite à la stimulation « <i>in vitro</i> » par LPS.....	32
2.5	La détection d'IgG, IgG1 ET IgG2a à partir du sérum.....	33
2.6	La culture des cellules spléniques « <i>in vitro</i> ».....	33
2.7	Évaluation de l'apoptose des cellules B.....	34
2.8	L'analyse des résultats.....	34
CHAPITRE III		
	RÉSULTATS.....	36
3.1	Effet de l'infection par <i>Plasmodium</i> sur la purification de cellules B et mesure de l'activité métabolique des lymphocytes B suite à une stimulation par un antigène thymus-indépendant.....	36
3.2	Effet de l'infection par <i>P. c. adami</i> sur la réponse primaire d'anticorps contre la γ - globuline humaine.....	38
3.3	Effet de l'infection par <i>P. c. adami</i> DK sur la réponse secondaire d'anticorps contre la γ -globuline humaine.....	40

3.4 Effet d'anticorps monoclonaux anti-MIF sur la prolifération des cellules spléniques.....	42
3.5 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse d'anticorps IgG totaux contre <i>P. chabaudi adami</i> (antigène homologue).....	45
3.6 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse IgG contre la γ -globuline humaine.....	46
3.7 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse IgG contre la γ -globuline humaine après l'infection par <i>P. chabaudi adami</i> DK (antigène hétérologue).....	47
3.8 Effet de la neutralisation du MIF sur l'apoptose des cellules B.....	48
CHAPITRE IV	
DICUSSION.....	51
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	56
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	57

LISTE DE FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 Cycle de vie de <i>Plasmodium</i>	7
Figure 1.2 Activation des cellules B.....	18
Figure 1.3 Mode d'action du MIF.....	27
Figure 3.1 Activité métabolique des cellules B de souris infectées par <i>P.c.adami</i> DK.....	37
Figure 3.2 Titres d'IgG totaux et IgG1 spécifiques à la γ -globuline humaine chez des souris infectées avant immunisation.....	39
Figure 3.3 Titre d'IgG totaux (A) et d'IgG1 (B) spécifiques à la γ -globuline humaine chez des souris infectées par <i>P.c. adami</i> après l'immunisation.....	41
Figure 3.4 Analyse de la prolifération de cellules spléniques isolées de souris neutralisées avec un anticorps anti-MIF.....	43
Figure 3.5 Production d'IFN- γ par les cellules spléniques en provenance de souris contrôles ou traitées avec l'anticorps anti-MIF <i>in vivo</i> durant l'immunisation avec la γ -Globuline	44
Figure 3.6 Anticorps IgG contre <i>P. chabaudi adami</i> DK chez de souris traitées avec l'anticorps anti-MIF.....	45
Figure 3.7 Titre d'anticorps IgG totaux anti- γ -globuline humaine chez des souris naïves et traitées avec un anticorps anti MIF.....	46
Figure 3.8 Titre d'anticorps IgG totaux chez des souris infectées avec <i>P.c. adami</i> et traitées avec un anticorps anti MIF.....	47
Figure 3.9. Effet de la neutralisation du MIF sur l'apoptose et la nécrose des cellules B 220 ⁺	49
Figure 3.10 Mortalité des cellules B 220 ⁺ après une infection par <i>P.c. adami</i>	50

LISTE D'ABRÉVIATIONS

APC	Allophycocyanin
BAFF	B cell Activator Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CIDR1	Cysteine-Rich Interdomain Region 1
MCH	Major Histocompatibility factor
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CpG-ODN	CpG oligodéoxynucleotides
cPLA2	Cytosolic phospholipase A2
DDT	Dichloro-Diphenyl-trichloroethane
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FBS	Foetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GDH	Glutamate dehydrogenase
HRP	Horseradish Peroxidase
HST	Transférine de Serum humain
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
HZ	hémotoïne
IFN- γ	Interféron-gamma
IL	Interleukine
IgG	Immunoglobuline
Jab-1	Jun activating binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase

MIF	Macrophage Migratory Inhibitory Factor
MT-PMS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium phenazine methosulfate
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa Beta
NK	Natural Killer
NO	Nitric oxide
PVP	Polyvinylpyrrolidone
TLR	Toll Like Receptors
TMB	Tetramethyl benzidine.
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBS- T	Phosphate Buffer Saline-Tween
TNF- α	Tumor Necrosis Factor-alpha
TGF- β	Tumor Growth Factor-Beta

RÉSUMÉ

Les infections par *Plasmodium* induisent des changements importants sur la réponse effectrice et la régulation des cellules B. Ces effets se caractérisent par une suppression de la production d'anticorps contre des antigènes hétérologues et par une activation polyclonale non spécifique des cellules B. Nous avons centré notre attention sur le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF), une cytokine sécrétée de façon constitutive chez plusieurs types cellulaires et intensifiée durant l'infection par *Plasmodium*. Le MIF inhibe l'apoptose des cellules B «*in vitro*» et son rôle dans les altérations des cellules B durant la malaria n'a pas encore été évalué.

En utilisant des souris BALB/c infectées avec *P. chabaudi adami* DK avant et suite à un régime d'immunisation avec de la γ -globuline humaine, nous avons observé que l'infection après l'immunisation réduit significativement les titres d'IgG totaux et IgG1 anti- γ -globuline humaine. Le possible rôle du MIF a été vérifié en neutralisant des souris BALB/c (immunisées avec de la γ -globuline humaine) avec anti-MIF. Les résultats démontrent une augmentation significative d'IFN- γ ; une diminution de cellules B annexine +; mais aucun effet significatif sur la production d'anticorps.

Étant donné que le MIF est présent pendant les infections nous avons neutralisé le MIF avant et après l'infection par *P. chabaudi* DK. L'inhibition dans les titres d'anticorps spécifiques à la γ -globuline induit par l'infection était comparable chez des souris traitées avec l'anti-MIF, ce qui suggère que le MIF n'y participe pas. Malgré les effets suggérés «*in vitro*» sur des cellules B, nos études ont démontré une diminution de cellules B, PI+ chez des souris infectées et neutralisées.

En conclusion, nous pouvons dire que le MIF ne semble pas participer dans l'activation polyclonale non spécifique des cellules B durant la malaria et nous suggérons d'évaluer le temps de vie des anticorps en évaluant l'expression du récepteur néonatale Fc (FcRn) qu'y est impliqué à la régulation, le rôle des cellules T régulatrices ainsi que la modulation de l'expression du complexe CD74-CD44 durant les infections par *Plasmodium*.

Mots clés : Malaria, cellules B, réponse d'anticorps, MIF, activation polyclonale.

INTRODUCTION

La malaria ou paludisme, maladie causée par des parasites du genre *Plasmodium*, est responsable de plus de deux millions de morts et de plus de 500 millions de cas cliniques chaque année (Good, 2001; Snow et al., 1999). Les nombres de cas de malaria dans les pays où l'infection n'est pas endémique sont en augmentation dû au mouvement migratoire de la population humaine (Paxton et al., 1996).

Chez l'homme, la malaria est caractérisée par la fièvre, conséquente à la réponse inflammatoire de l'hôte, et par une anémie sévère, générée par la destruction accrue d'érythrocytes et par inhibition de l'érythropoïèse à cause de l'inflammation. La phase intra-érythrocytaire de l'infection est ainsi responsable de la pathologie associée à l'infection, caractérisée par l'anémie, et aussi de la forme cérébrale de malaria, qui est une des causes principales de mortalité chez des jeunes enfants infectés (Engwerda et al., 2002).

La résistance des parasites aux médicaments et la résistance du vecteur (*Anopheles*) aux insecticides ont empêché l'éradication de cette grave infection, raison pour laquelle un énorme effort est consacré à l'obtention de vaccins capables de contrôler l'infection (Sauerwein, 2009). Néanmoins, cette tâche s'avère difficile et complexe à cause de :

- La complexité du cycle de vie du parasite, caractérisé par une grande diversité antigénique,
- La variation des molécules les plus ciblées par le système immunitaire (variation antigénique) et
- L'immunosuppression induite pendant l'infection, qui se traduit par la capacité du parasite à inhiber la réponse immune, réduisant ainsi les mécanismes protecteurs

contre l'infection, et rendant les patients vulnérables aux infections secondaires et incapables de répondre aux vaccins (Millington et al., 2006).

Les infections par *Plasmodium* sont également associées à l'activation polyclonale non-spécifique des cellules B, lesquelles secrètent des anticorps reconnaissant des antigènes hétérologues et du soi comme l'actine, la myoglobine, la myosine et l'ADN. En plus, une hypergammaglobulinémie, consistant dans l'augmentation des niveaux des immunoglobulines dans le sérum, est générée chez l'hôte. (Reina-San-Martin et al., 2000).

Les activateurs polyclonaux dérivés des parasites sont normalement des composants de la membrane cellulaire, du cytosol ou des produits de sécrétion, mais chez l'infection expérimentale de la souris, aucune molécule dérivée de *Plasmodium* n'a pas encore été décrite comme activatrice polyclonale (Montes et al., 2007).

Dans notre laboratoire, nous avons démontré l'induction du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) chez des souris infectées par *Plasmodium chabaudi adami* (souches DS et DK). Le MIF est une cytokine polyvalente, constitutivement exprimée par différents types de cellules incluant les macrophages, les cellules T, les éosinophiles, les neurones, les cellules endothéliales (Calandra and Roger, 2003).

Dans ce contexte, Starlets (2006) a démontré que le MIF induit l'activation et la prolifération des cellules B naïves en promouvant différents types de réponses liées à la division cellulaire, incluant l'élargissement des cellules, la suppression de l'apoptose, l'inactivation des inhibiteurs du cycle cellulaire et l'induction de cycline (Gore et al., 2008; Starlets et al., 2006). Présentement, une diminution de la réponse

de cellules T auxiliaires de type 2 (cellules stimulatrices de la production d'anticorps) a été décrite chez des souris déficientes en MIF (MIF^{-/-}), suggérant que le MIF peut favoriser cette réponse (Leng et al., 2003).

Dans cette étude nous avons évalué le rôle possible du MIF dans l'activation polyclonale de cellules B pendant les infections par *Plasmodium chabaudi adami* DK. Nous avons postulé que la sécrétion de MIF durant l'infection pourrait favoriser l'activation polyclonale non spécifique des cellules B et ainsi avoir un impact négatif sur la réponse sérologique induite par un immunogène.

CHAPITRE I

ÉTAT DE CONNAISSANCES

1.1 La Malaria.

La malaria, causée par des *parasites* du genre *Plasmodium*, est un des problèmes de santé publique les plus inquiétants dans le monde (Crabb and Beeson, 2005).

Il y a quatre espèces de *Plasmodium* qui parasitent l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malarie* (Deans and Cohen, 1983). Ces espèces induisent une morbidité différente, résumée dans le Tableau 1. (Stevenson and Riley, 2004).

Parasite	Cause
<i>P. falciparum</i>	Cause la forme létale de malaria
<i>P. vivax</i>	Responsable de la plupart des cas cliniques, rarement létal.
<i>P. malarie</i>	Cause rarement des cas cliniques.
<i>P. ovale</i>	Cause rarement des cas cliniques.

Tableau No. 1. Espèces de *Plasmodium* causant des maladies chez l'homme..
Stevenson M. et E. Riley. 2004. Innate Immunity Malaria. Nature Publishing
Group 4 :169-180.

Chez la souris il y a aussi quatre espèces de *Plasmodium* identifiées:

- *P. chabaudi*, qui est utilisé pour étudier l'immunologie et les mécanismes d'immunorégulation orchestrés par les cytokines. La souche DK de *P.c. adami* cause une infection non létale et la souche DS cause une infection létale.
- *P. berghei*, qui est utilisé pour étudier la pathologie cérébrale (souche ANKA) et,
- *P. yoelii*, qui est utilisé pour étudier les mécanismes immuns et la pathologie, incluant la malaria cérébrale et aussi pour identifier la réponse immune induite par de vaccines (Stevenson and Riley, 2004).

Le nom « mal-aria » (« mauvaise aire ») a été assigné à la maladie par les italiens. Des cas de malaria ont été documentées à partir de 1600, et en 1880 (Medicine, September 2003 1998-2003, posting date), Charles Louis Alphonse Laveran, un médecin français, a identifié les parasites dans le sang des personnes infectées. Finalement, en 1948 le cycle de vie du parasite a été décrit et la participation du moustique *Anopheles* comme vecteur de transmission a été confirmée (Najera, 2001).

1.2 Le cycle de vie du parasite.

Le cycle de vie du parasite nécessite un hôte invertébré, le moustique *Anopheles*, qui transmet l'agent étiologique à l'homme (Kappe et al., 2003; Wellems and Miller, 2003). Le moustique représente l'hôte définitif, chez lequel la phase sexuelle du *Plasmodium* a lieu, débutant par la fertilisation des gamétocytes ingérés. Chez le moustique, un oocinète se forme et pénètre l'estomac de l'insecte, pour former ensuite un oocyste. La sporogonie se développe et des sporozoites matures dans l'oocyste sont libérés et se dirigent vers les glandes salivaires. Cette forme infecte les

humains et/ou vertébrés grâce à l'alimentation subséquente du moustique (Kappe et al., 2003; Wellems and Miller, 2003).

Chez les humains, les sporozoïtes migrent au foie et infectent les hépatocytes pour ainsi débiter la schizogonie ou cycle pré-érythrocytaire. Cette période varie en dépendant de la espèce de *Plasmodium* est finisse lors de la rupture du hépatocyte. Dans l'hépatocyte, le parasite se différencie en mérozoïtes, lesquels sont libérés dans le flux sanguin et infectent ensuite les érythrocytes (Kumar et al., 2002).

À l'intérieur de l'érythrocyte, une deuxième schizogonie commence et des nouveaux mérozoïtes sont libérés suite à la lyse des globules rouges. La majorité des mérozoïtes infectent d'autres globules rouges et une petite partie se différencie en gamétocytes, qui vont ainsi assurer la continuation de la phase sexuelle du parasite. (Fig. 2.1) (Bruce et al., 1990; Miller et al., 2002).

1.3 Manifestations cliniques.

Chez les humains, la malaria déclenche deux manifestations cliniques importantes : la fièvre, à cause de la réponse inflammatoire de l'hôte, et l'anémie. La fièvre coïncide avec la rupture des mérozoïtes chaque 48 à 72 heures et varie en fonction de l'espèce du parasite (Lamb et al., 2006). Elle est causée par la libération de facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) par des macrophages (Clark, 1987; Whittle et al., 1990). Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire avec deux effets durant l'infection : un effet protecteur en diminuant la parasitémie, et des effets pathologiques lorsque produit en excès, en inhibant l'érythropoïèse et en augmentent l'adhésion des globules rouges infectés aux capillaires dans le cerveau (Long et al., 2008)

L'anémie est une conséquence de la destruction d'érythrocytes (Kai and Roberts, 2008), de l'inefficacité du recycler le fer sur la forme d'hémozoïne (pigment malarique composé des polymères de fer dérivés du métabolisme de l'hémoglobine par le parasite) qui est également associé à la suppression de la érythropoïèses (Casals-Pascual et al., 2006), et d'une érythropoïèse déficiente, causée par des cytokines pro-inflammatoires (Awandare et al., 2007; Keller et al., 2006).

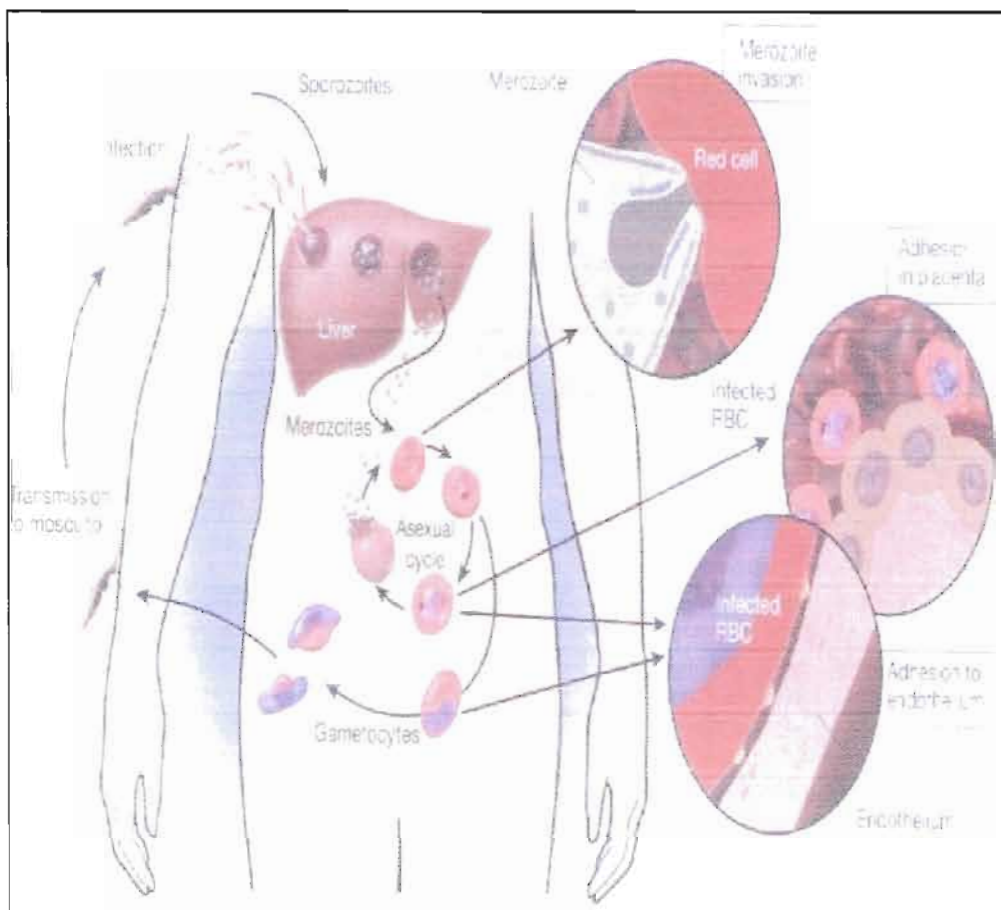


Figure 1.1. Cycle de vie de *Plasmodium*. De : Miller, L. H., et al. (2002).
"The pathogenic basis of malaria." *Nature* 415(6872): 673-9.

Une complication additionnelle exclusive des infections par *P. falciparum* est la malaria cérébrale, pathologie qui semble dépendante du TNF- α , qui régule l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire (CAM-1) sur les vaisseaux cérébraux, en provoquant l'adhérence des globules rouges infectés à l'endothélium (Engwerda et al., 2002; Miller et al., 1994). Chez *P. berghei*, la séquestration de parasites a lieu par intermédiaire des molécules d'adhésion et par CD36, qui est un récepteur endothélial qui se trouve chez les macrophages et les cellules dendritiques (CD). La participation de cette molécule, qui a été impliquée à l'adhérence de globules rouge infectés, n'ai pas encore démontrée dans la pathologie cérébrale, étant donné que les souris CD36^{-/-} présentent la pathologie (Franke-Fayard et al., 2005). Les parasites séquestrés peuvent être reconnus par des récepteurs de reconnaissance de patronnes des pathogènes (PPRR) exprimés par les macrophages résidant dans la micro vasculature cérébrale. Suite à leur activation, les macrophages sécrètent de chemokines comme le CCL5/RANTES, ce-qui stimule le recrutement additionnel de macrophages et de lymphocytes à l'endothélium. Les macrophages activés vont aussi sécréter de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α . La migration de lymphocytes au cerveau, particulièrement les cellules T CD8⁺ est impliquée dans le développement de la malaria cérébrale (Lamb et al., 2006).

La malaria cérébrale est caractérisée par des fortes céphalées et des convulsions, et frappe particulièrement les enfants, les femmes enceintes et les individus non immuns. L'élévation de la pression intracrânienne avec œdème cérébral et les crises convulsives peuvent être très marquée chez les enfants; une fois le coma installé, la mortalité atteint rapidement 20 à 30 % des cas (White and Ho, 1992).

1.4 Le traitement.

La quinine, un alcaloïde provenant de l'arbre du genre *Cinchona* (Rubiaceae), a été le premier agent utilisé pour contrer les différents symptômes associés aux infections par *Plasmodium*, mais dernièrement son administration a été limitée aux cas sévères de malaria en raison des effets secondaires (Tzianetas et al., 1996).

Le cycle biologique complexe du parasite et sa capacité à devenir résistant aux médicaments anti-malariques représentent des obstacles au développement d'un traitement de contrôle efficace (Daily, 2006). Des composants tels que la chloroquine phosphate, la quinine, la méfloquine, la primaquine phosphate, la sulfadoxine-pyriméthamine et l'atovaquone-proguanil sont utilisés comme traitements mais dans certains cas, ils sont inefficaces à sauver la vie des patients.

Actuellement, plusieurs alternatives ont été développées tel que des dérivés de la chloroquine originale ou de nouvelles drogues. Malheureusement, à cause des hauts coûts de production et de la possibilité d'avoir une résistance, leur utilisation n'est pas optimale.

En ce qui concerne l'éradication du moustique, l'OMS a abandonné l'idée en 1967 au bénéfice du contrôle de l'infection dû au fait que les moustiques sont devenus résistants au DDT.

1.5 L'immunologie de *Plasmodium*.

Plasmodium est un organisme très complexe et l'hôte développe des réponses immunes protectrices dépendantes et indépendantes du complexe major d'histocompatibilité (CMH) pour contrôler l'infection (Troye-Blomberg, 2002).

1.5.1 L'immunité naturellement acquise.

Les effets protecteurs des réponses immunes innées ont été documentés; cette protection s'exprime comme la capacité de l'hôte à contrôler la maladie et la densité du parasite (Doolan et al., 2009). L'immunité adaptative (spécifique et de mémoire) apparaît chez les enfants de 7 à 10 ans, qui sont ensuite capables de gérer l'infection par *Plasmodium*. Cette immunité est appelée non-stérile car les personnes infectées peuvent toujours acquérir l'infection et avoir des symptômes cliniques mais ils ne souffrent pas des pathologies sévères. Deux explications ont été suggérées, la première se base sur la résistance acquise suite au contact avec plusieurs variantes de *Plasmodium* et qui nécessite une stimulation permanente, soutenue par la présence du parasite. La deuxième explication propose l'existence des réponses immunes intrinsèques dépendantes de l'âge de l'hôte (Doolan et al., 2009).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'induction de la réponse immune adaptative contre la malaria sont encore méconnus et sont le point de recherche pour le développement de vaccins. Néanmoins; nous savons que la résolution de l'infection est dépendent du balance entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires, et différents laboratoires ont démontré que les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques et les cellules NK (Natural Killer) sont les principaux cellules du system inné qui régulent le balance de cytokines pendant l'infection (Stevenson and Riley, 2004). Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-6, l'IL12, l'IL-1 et l'IFN- γ) sont impliquées dans la réduction de la parasitémie (Hunt and Grau, 2003; Malaguarnera and Musumeci, 2002; Stevenson and Riley, 2004). L'IFN- γ active les macrophages à produire de l'IL-6, l'IL-12, le TNF- α , les espèces réactives au oxygène et les intermédiaires du nitrogène (Clark et al., 1997; Malaguarnera and Musumeci, 2002).

Les cellules NK jouent un rôle également important, lorsqu'elles sont activées par l'IL-12, en produisant l'IFN- γ . Ces cellules augmentent la production d'IL-12 par les cellules dendritiques et promeuvent la sécrétion de IFN- γ par les cellules T-CD4⁺ (Ing and Stevenson, 2009).

Les forts niveaux de cytokines pro-inflammatoires génèrent chez l'hôte les symptômes cliniques, et les cytokines anti-inflammatoires (TGF- β , l'IL-10 et l'IL-4) semblent être nécessaires aussi pour la protection d'hôte (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Stevenson and Riley, 2004). Ainsi, le TGF- β joue un rôle important dans la transition de la réponse du type Th1 (pro-inflammatoire) à réponse de type Th2 (anti-inflammatoire) durant la phase aigüe et la phase de résolution de l'infection (Tsunawaki et al., 1988). L'IL-10 inhibe l'activation des macrophages, en supprimant la production de TNF- α , l'IL-6 et l'IFN- γ (Akdis and Blaser, 1999).

1.5.2 L'immunité contre les sporozoïtes.

La migration des sporozoïtes de l'intestin aux glandes salivaires du moustique, amène à une augmentation de leur capacité d'infection et à l'expression d'un antigène spécifique à cette étape, dans leur surface. Cet antigène, la protéine du circumsporozoïte (CS), réagit avec le sérum immun, réaction qui laisse un précipité (Deans and Cohen, 1983). Les anticorps contre la protéine CS bloquent la motilité des sporozoïtes, ce qui est requis pour l'infection des hépatocytes de l'hôte (Kierzenbaum, 1993). Des études ont démontré que la partie C terminal de la protéine CS partage d'homologie avec les trombospondines (de molécules d'adhésion), ce qui suggère que cette protéine pourrait fonctionner comme ligand d'un récepteur cellulaire dans le foie (Pancake et al., 1992).

1.5.3 L'immunité contre des antigènes exo-érythrocytaires.

Des modèles expérimentaux ont fourni la plupart de l'information concernant la réponse immune contre les formes exo-érythrocytaires. Les cellules T CD8⁺ y jouent un rôle prépondérante, et l'élimination des hépatocytes infectés par les cellules T CD8⁺ semble être dirigée par les molécules du CMH de classe I, lesquelles lient des antigènes dérivés des parasites intracellulaires ou des sporozoïtes (Weiss et al., 1990).

Les cellules T peuvent également bloquer le développement de l'étape exo-érythrocytaire par la sécrétion des cytokines, comme l'IFN- γ (Schofield et al., 1987). L'IFN- γ a la capacité d'inhiber le développement des formes exo-érythrocytaires des hépatomes «*in vitro*» et en absence d'autres cellules; en plus, l'IFN- γ active l'oxyde nitrique synthétase, enzyme qui catalyse la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de L-arginine. Le NO est impliqué dans la destruction des protozoaires intracellulaires (Nardin and Nussenzweig, 1993).

1.5.4 L'immunité contre la phase érythrocytaire.

Les cellules T CD4⁺ jouent un rôle très important dans l'élimination des parasites intra érythrocytaires à travers la sécrétion des cytokines. Dans ce sens, l'IL-12 produite par les cellules dendritiques et les macrophages activés stimulent une réponse de type Th-1, qui est aussi favorisée par la production d'IFN- γ par les cellules NK (Natural Killer) (Wipasa et al., 2002).

Les cellules mononucléaires sanguines périphériques provenant des enfants avec des infections faibles produisent une forte concentration d'IFN- γ lorsqu'elles sont stimulées avec des antigènes du mérozoïte. Par contre, chez les enfants avec malaria sévère cette production d'IFN- γ est faible, et ces enfants sont plus

susceptibles à la réinfection (Luty et al., 1999). Des souris défectueuses dans la production d'IFN- γ (IFN- γ -/-) ont une réponse prédominante de type Th-2, ce qui est associée à une susceptibilité accrue à *P. chabaudi* et qui suggère que l'IFN- γ est un élément clé dans la résistance (Wipasa et al., 2002).

Le TNF- α protège en augmentant la capacité phagocytaire des monocytes mais possède aussi des effets pathologiques, étant associé entre autre à la splénomégalie, à la perte de poids et à l'anémie. la neutralisation de TNF- α augmente la survie des souris infectées, et chez l'humaine, une corrélation entre le TNF- α et l'hypoglycémie et mortalité a été rapportée. Au début de la maladie, la présence de TNF- α dans la rate confère une protection contre l'infection par *P. chabaudi* AS chez les souris C57BL/6, mais chez la souris A/J (susceptible) la concentration de TNF- α augmente dans le sérum et le foie à la fin de l'infection (Jacobs et al., 1996).

1.6 L'immunosuppression induite par *Plasmodium*.

La malaria induit des altérations du système immunitaire. Des susceptibilités aux salmonelloses et autres infections bactériennes et virales ont été associées à l'état aigue de l'infection (Greenwood, 1974).

Des enfants infectés par *Plasmodium* ne répondent pas d'une manière normale aux vaccins contre le tétanos, *Salmonella typhi* et méningocoques du groupe C, par rapport aux enfants non-infectés (Greenwood et al., 1978; Williamson and Greenwood, 1978). Ces observations et les associations des infections par *Plasmodium* et le lymphome de Burkitt ont stimulé l'étude des modifications induites par *Plasmodium* sur le système immunitaire.

1.6.1 La suppression de la réponse humorale.

L'immunosuppression est une caractéristique prépondérante des infections par *Plasmodium*. Différentes études ont démontré une suppression, pendant l'infection, de la réponse d'anticorps dirigée contre plusieurs antigènes non malariques, comme la toxine tétanique et l'antigène « O » de *Salmonella*. La réponse immune acquise semble aussi être inhibée, ainsi que le développement de l'hypersensibilité retardée (Stevenson and Skamene, 1986).

En utilisant des modèles murins, il a été démontré que des animaux infectés ne développent pas une réponse d'anticorps normal lorsque ils sont immunisés avec des antigènes T dépendent et T indépendants (Weidanz, 1982). L'effet immunodépresseur des infections par *Plasmodium* sur la réponse d'anticorps est plus prononcé lorsque l'antigène est injecté dans la phase aiguë de la parasitémie, et il est associé à une induction défectueuse de la mémoire immunologique (Greenwood et al., 1971). Ces observations ont été mises en évidence par Orjih et Nusseenzweig (1979); les chercheurs ont injecté des sporozoites irradiés chez des souris infectées par *P. berghei*, et ils ont démontrés que la réponse humorale a été réduite d'une manière proportionnelle à la densité du parasite (Orjih and Nussenzweig, 1979).

En utilisant des modèles murins de malaria, une diminution des niveaux d'anticorps contre la transferrine de sérum humain (HST), contre l'albumine du sérum de bovin (BSA), des antigènes thymus-dépendants, qui nécessitent la participation des cellules Th2 et, contre le polivinylpyrrolidone (PVP), un antigène thymus-indépendant, ont été observés chez les souris infectées. Cette dernière observation suggère que l'infection par *Plasmodium* peut avoir un effet direct sur les cellules B et pas nécessairement sur les cellules Th (Goumard et al., 1982). En plus, l'infection inhibe des réponses d'anticorps préexistantes. Finalement, il a été suggéré

que l'infection par *Plasmodium* peut aussi modifier l'avidité de l'anticorps pour certains antigènes (Steward and Voller, 1973).

Les infections par *Plasmodium* ne seulement diminuent la réponse contre des antigènes hétérologues. Wykes et al, 2005, ont démontré que des vaccins contenant la protéine de surface du mérozoite génèrent des cellules B de mémoire et cellules plasmatisques de longue vie et que ces cellules diminuent sa capacité à répondre après une infection par *Plasmodium*. Dans cette étude, une augmentation de 6 fois des cellules B CD19⁺/CD27⁺ en apoptose a été mesurée en suggérant que les cellules B de mémoire reçoivent des signaux pro-apoptotiques durant leur activation ou que elles n'ont pas été activées (Wykes et al., 2005).

1.6.2 Mécanismes de l'immunosuppression pendant les infections par *Plasmodium*.

Plusieurs recherches ont suggéré que les cellules dendritiques ainsi que les macrophages, sont les principales cellules impliquées dans l'immunosuppression par *Plasmodium* (Weidanz, 1982). Plusieurs effets ont été décrits : une inhibition de la maturation et de la fonction de cellules dendritiques, un apprêtement et une présentation inefficace des antigènes par les macrophages, ainsi que la production de facteurs suppressifs solubles par ces derniers (Austyn, 2000). L'hémozoïne (pigment malarique) a été impliquée dans l'inhibition de la fonction de cellules dendritiques et des macrophages dans plusieurs travaux (Scorza et al., 1999; Urban and Todryk, 2006). En plus, la présence d'une forte concentration d'antigènes exprimés par les globules rouges infectés semble empêcher des réponses immunes contre des antigènes hétérologues, comme par exemple les vaccins et d'autres pathogènes (Millington et al., 2006; Urban and Todryk, 2006).

Il y a des évidences suggérant que l'état de maturation des cellules dendritiques contrôle leur fonction et leur capacité à réguler et à induire une réponse

immune acquise (Becker et al., 2006; Oldenhove et al., 2003). Des études réalisées sur les cellules dendritiques sont contradictoires, et semblent indiquer que certains paramètres tel que l'espèce de *Plasmodium*, la dose d'infection et le type de cellule ciblée pourraient influencer leur effet sur l'immunité (Stevenson and Urban, 2006; Stevenson and Zavala, 2006).

Du point de vue immunologique, *Plasmodium* est un microorganisme complexe, occasionnant des réponses immunes multiples chez les souris et les humains à cause de son cycle de vie. Au début de l'infection, la réponse immune de l'hôte est faible, à cause de la petite quantité de sporozoites inoculés par le moustique vecteur et de leur migration rapide vers le foie, où le parasite change de forme et acquiert des nouvelles caractéristiques biologiques. En plus de l'immunosuppression, le parasite possède des stratégies pour éviter sa reconnaissance et son élimination par le système immunitaire :

- a) la diversité antigénique : des changements dans les antigènes de surface pendant chaque étape du cycle de vie, ce qui mènent à la nécessité de mécanismes protecteurs immuns pouvant ou non être dépendant du CMH (Plebanski and Hill, 2000; Troye-Blomberg, 2002; Zambrano-Villa et al., 2002) et,
- b) la variation antigénique : les protéines spécifiques à chaque étape sont polymorphiques, surtout s'il y a des régions répétitives, lesquelles régulent la maturation d'isotype d'anticorps et la production d'anticorps de haute affinité, en agissant comme super antigènes des cellules B et en induisant une réponse humorale polyclonale (Zambrano-Villa et al., 2002).

1.7 L'activation des cellules B et la réponse sérologique.

1.7.1 Les antigènes thymus dépendent.

L'activation des cellules B nécessite deux signaux. La cellule B reconnaît l'antigène par son anticorps membranaire, et l'internalise (signal I). Ensuite, l'antigène est apprêté et présenté sous une forme associée aux molécules du CMH de classe II exprimées par la cellule B, qui peuvent être reconnues par la cellule T CD4⁺ via son récepteur membranaire (TCR). L'activation de la cellule T par la cellule B amène l'expression de CD40L sur la cellule T, qui va réagir avec le CD40, exprimé par la cellule B. Cette interaction fournit le signal II nécessaire à l'activation de la cellule B. (Fig. 2.2) Ce processus a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (Kindt et al., 2007). Par ailleurs, la différenciation des cellules B a lieu dans les centres germinatifs et implique trois événements : la maturation par affinité, la commutation de classe et la formation de cellules plasmiques et de cellules B mémoires (Kindt et al., 2007)

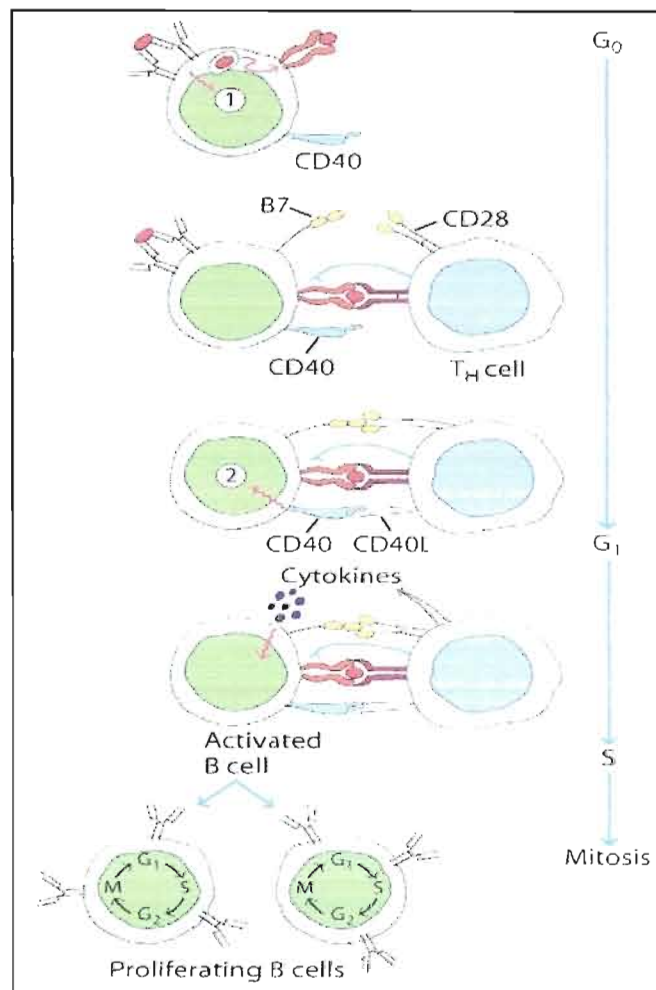


Figure 1.2. Activation des cellules B. De : Golbsby R., K.T. et B. Osborne. Kuby Immunology. 6th Ed. 2006

La maturation par affinité : Les cellules B activées migrent vers les centres germinatifs, où elles expriment moins d'Ig de surface et passent par un processus d'hypermutation somatique, caractérisé par le réarrangement des gènes de la région variable des anticorps, groupés dans les régions qui déterminent la complémentarité avec l'antigène. Ce processus génère au hasard des cellules B avec des récepteurs (Ig membranaires) de haute et de faible affinité pour l'antigène. Une sélection positive

dans le centre germinatif sauvegarde les cellules B avec une haute affinité pour l'antigène et élimine les cellules avec une faible affinité (Kindt et al., 2007).

La commutation de classe : après la stimulation antigénique des cellules B, l'ADN codant pour la chaîne lourde de l'Ig subit un réarrangement additionnel, où le segment génique de la région constante de la chaîne lourde (C_H) de n'importe quel isotype, peut se combiner avec les segments $V_H D_H J_H$ de la région variable de la chaîne lourde. Cette combinaison garde la spécificité de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope, mais change sa fonction effectrice. Les cytokines libérées par les cellules T permettent la prolifération des cellules B activées et activent aussi la commutation de classe pendant la différenciation des cellules B en cellules plasmiques sécrétrices d'anticorps. Chez les antigènes thymus-dépendants, l'interaction entre la molécule CD40 de la cellule B et la molécule CD40L de la cellule T_H est essentiel pour l'induction de la commutation de classe.

Finalement, les cellules B se différencient en cellules plasmiques qui sécrètent une grande quantité d'anticorps et en cellules B mémoires. Cette différenciation exige un changement au niveau de la signalisation cellulaire et la transcription de gènes (Kindt et al., 2007).

1.7.2 Les antigènes thymus indépendant.

Il y a deux types des antigènes thymus indépendant (TI) qui sont connus :

Les antigènes TI du type I sont des activateurs polyclonaux qui activent les cellules B, sans impliquer une spécificité antigénique. L'antigène TI du type I plus connu est le LPS, le principal component de la paroi cellulaire des bactéries gram-positives. Les mécanismes pour lesquelles ces activateurs (mitogènes) stimulent la production d'anticorps n'est pas encore claire (Kindt et al., 2007)

Les antigènes TI du type 2 ne sont pas des activateurs polyclonaux, sont activateurs des cellules B matures et inhibiteurs de cellules B immatures. Ces antigènes n'ont pas besoin de cellules Th, mais nécessitent des cytokines pour la prolifération de cellules B et pour la commutation de classe (Kindt et al., 2007).

En utilisant le modèle de *P. chabaudi* chez les souris, il a été démontré que les cellules B et les cellules T CD4⁺ sont essentielles pour le développement de l'immunité protectrice pendant l'infection (Meding and Langhorne, 1991; Podoba and Stevenson, 1991). Cette réponse a lieu après le pic d'infection, et les anticorps d'isotype IgG1 semblent prédominer chez la souris, ce qui suggère que la malaria est associée à une réponse de type Th2, caractérisée par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13 (Stevenson and Zavala, 2006). Néanmoins, Su et collaborateurs (2002) ont détecté des isotypes d'anticorps associés à une réponse de type Th1, tels que l'IgG2a et l'IgG3, ainsi qu'une forte réponse de type Th2 pendant l'infection par *P. chabaudi* AS. Dans le modèle d'infection murin par *P. chabaudi*, une augmentation des niveaux de IFN- γ et IgG2a avec un important rôle protecteur contre la maladie et les infections secondaires a également été démontrée (Su and Stevenson, 2002).

Selon Taylor and Philips (1994), les facteurs régulant la différenciation des cellules Th0 en Th1 ou Th2 après une activation par *Plasmodium* dépendent de la production de cytokines, de la nature des cellules présentatrices d'antigène, de la charge antigénique et de l'apprêtement de l'antigène par les cellules. (Taylor-Robinson and Phillips, 1994). Ils ont suggéré que les cellules B sont impliquées dans la régulation de l'immunité protectrice du type Th1 et/ou Th2 par *P.c.adami*.

1.8 Mécanismes d'apoptose chez les cellules B pendant les infections par *Plasmodium*.

L'apoptose des cellules B pendant des infections par *P. chabaudi* a été déjà rapporté; mais les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus. Helmby et al., 2000 ont reporté une augmentation dans la fréquence et le nombre des cellules B apoptotiques au pic de l'infection par *P. chabaudi*. A ce moment, la réponse immunologique change de Th1 à Th2 et une forte immunosuppression se manifeste (Ahvazi et al., 1995; Taylor-Robinson, 1997), ce qui suggère que l'apoptose des cellules B pourrait être impliquée dans la suppression (Helmby et al., 2000).

Différents mécanismes ont été suggérées qui impliquent des antigènes dans l'apoptose des cellules B avec une fausse spécificité dans les centres germinales (Krammer et al., 1994). L'augmentation de l'expression de Fas et FasL, pendant les infections par *P. chabaudi* pourrait expliquer, au moins en partie, l'apoptose des cellules B (Helmby et al., 2000).

1.9 L'activation polyclonale des cellules B pendant les infections par *Plasmodium*.

Il est bien connu que l'infection par *Plasmodium* augmente les niveaux d'Ig et le nombre de cellules B sécrétrices d'anticorps. La production des anticorps spécifiques au parasite est importante dans la protection, mais dans le cas de *Plasmodium*, la réponse des cellules B comprend des auto-anticorps et des immunoglobulines non spécifiques. Chez l'humain, l'activation polyclonale des cellules B est aussi associée à l'occurrence du lymphome splénique et du Burkitt (Bates and Bedu-Addo, 1997; Greenwood and Vick, 1975).

Les activateurs polyclonaux dérivés des parasites sont des composants de la membrane cellulaire, du cytosol ou des produits de sécrétion. Une région inter

domaine riche en cystéines (CIDR1a) avec des propriétés d'activatrices polyclonales des cellules B a été identifiée chez l'homme. Cette région est utilisée par les érythrocytes infectés pour interagir avec des cellules B (Donati et al., 2004). Néanmoins, chez les souris, les activateurs directs ou indirects restent inconnus.

Les activateurs polyclonaux sont caractérisés par leur capacité à induire la prolifération de multiples clones de cellules B et à réguler l'expression du Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), le CD69, le CD25, et des molécules co-stimulatrices comme le CD80 et le CD86 à surface des cellules B (Montes et al., 2007). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation polyclonale ne sont pas élucidés mais, à partir des études impliquant le LPS et des CpG-ODN, il a été démontré que ces deux molécules activent les cellules B par la voie des récepteurs de type TOLL (TLRs). Le CpG-ODN se lie au récepteur intracellulaire TLR-9 par un mécanisme qui est encore inconnu, mais qui semble impliquer une autre protéine de surface cellulaire. La signalisation par le TLR-9 déclenche des modifications au niveau de l'équilibre redox et induit des voies de signalisations diverses, telle que les protéines kinases activées par des mitogènes (MAPKs) et le facteur nucléaire de transcription- kappa B (NF- κ B) (Krieg, 2002). Le LPS quant à lui se lie à une protéine de liaison (LPS-BP) en formant le complexe LPS-LPSBP, qui est capturé par le CD14. Ce complexe, LPS-LPSBP-CD14, se lie au TLR-4 (TLR4-myéloïde protéine de différenciation 2) de la cellule B, et déclenche les voies de signalisation impliquant MyD88 et qui induisent l'activation de NF- κ B (Hoshino et al., 1999).

La participation de différentes cellules et cytokines dans l'activation polyclonale des cellules B a été suggérée. De nombreux activateurs polyclonaux sont modulés par des cellules accessoires comme les macrophages ou les cellules dendritiques, lesquelles peuvent être à leur tour stimulées par leur TLRs. La Glutamate

déshydrogénase (GDH) de *Trypanosoma cruzi* stimule la prolifération des cellules B sans l'aide des cellules T, mais nécessite des cellules CD11b⁺. Ainsi, le GDH amène à la production d'IL-6, d'IL-10 et du facteur activateur des cellules B (BAFF), lesquelles agissent en synergie pour stimuler la prolifération des cellules B (Montes et al., 2007).

1.10 Le facteur d'inhibition de la migrations des macrophages (MIF).

Le MIF est une cytokine polyvalente sécrétée par la glande hypophyse et différents types de cellules incluant, les cellules T, les macrophages, les cellules B, et autres, mais les cellules T et les macrophages en sont la source la plus importante. Plusieurs fonctions ont été attribuées au MIF dans différentes maladies incluant le choc septique, des maladies infectieuses et inflammatoires, des maladies auto-immunes, l'athérosclérose et le cancer (Morand et al., 2006; Yasasever et al., 2007). Récemment a été démontré que le MIF est premièrement sécrété par les monocytes et macrophages et une fois sécrété il peut moduler l'expression de plusieurs cytokines pro inflammatoires, incluant TNF- α , l'IL-1, l'IL2, l'IL-6, l'IL-8; en plus, oxyde nitrique, la cyclooxygénase 2 (COX2). En générant oxydoréductase et COX2, le MIF peut prévenir l'apoptose déclenchée par la flambée oxydative et par la protéine p53. MIF aussi est associé aux réactions d'hypersensibilité retardée, la régulation du système immunitaire et l'induction d'une immunité protectrice (Calandra and Roger, 2003)

Différents mécanismes d'action ont été associés au MIF dans la régulation des pathologies, par l'induction de l'immunité innée et adaptative, l'induction de cytokines, chemokines et molécules d'adhésion, l'interaction avec des glucocorticoïdes, l'influence dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la phagocytose ainsi que l'activation du système de métallo protéinases matricielles (MMP) . (Bucala, 2007).

1.10.1 Le MIF et l'immunité innée.

Diverses recherches ont suggérées que le MIF joue un rôle important dans l'immunité innée comme cytokine pro-inflammatoire. Les cellules T, les cellules B, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les mastocytes expriment le MIF constitutivement. Le MIF est libéré par les macrophages suite à leur stimulation par l'endotoxine, les exotoxines et les cytokines telles que le TNF- α et l'IFN- γ . Le MIF libéré induit directement ou indirectement l'expression de cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-12, le NO et les produits dérivés de l'acide arachidonique et de métalloprotéines (Calandra et al., 2003).

1.10.2 Le MIF et l'anémie pendant les infections par *Plasmodium*.

L'anémie, un problème majeur dans la malaria, est causée par la destruction massive de globules rouges et par une diminution de l'érythropoïèse. Différents études ont suggéré la présence d'un fort inhibiteur de l'érythropoïèses en circulation (Yap and Stevenson, 1991), et les cytokines TNF α , l' IL-1 β , et l' IFN- γ ont été proposées comme candidates, mais les modèles expérimentaux n'ont pas confirmé leur rôle (Yap and Stevenson, 1994) .

Plusieurs études ont démontré l'accumulation du pigment malarique dans la moelle osseuse ainsi que dans les macrophages de la pulpe rouge de la rate (Yap and Stevenson, 1994). Martiney et al. (2000) a suggéré que le MIF pourrait être impliqué dans l'inhibition de l'érythropoïèse étant donné qu'une augmentation de MIF a été mesurée dans la rate et la moelle osseuse au pic d'infection par *P. chabaudi*. Ces études ont été appuyées par le fait que des souris transgéniques MIF^{-/-} développent moins d'anémie que les souris contrôle (McDevitt et al., 2006).

Néanmoins, les résultats d'Awandare, G et al, (2007) suggèrent que le MIF n'est pas le responsable de l'anémie sévère chez les enfants mais par contre, la accumulation d'hemozine dans les monocytes pourrait être impliquée directement ou indirectement dans l'activité suppressive du MIF (Awandare et al., 2007).

1.10.3 L'activité enzymatique du MIF.

Suite à sa purification et caractérisation moléculaire, différentes fonctions ont été associées au MIF, entre autres une activité tautomérase qui catalyse la conversion de 2-carboxy-2,3-dihydroindole-5,6-quinone (dopachrome) en 5,6 dihydroxyindole-2-carboxilique acide (DHICA) qui suggère son effet catalytique. Cependant, le D-dopachrome n'est pas un produit naturel et le substrat naturel du MIF demeure encore inconnu. Une autre caractéristique enzymatique du MIF est la présence du motif Cys-Xaa-Xaa-Cys (CXXC) qui appartient à la famille thiolprotein oxydoréductases (TPOR), ce qui confère au MIF la possibilité d'être impliqué directement dans la régulation de l'homéostasie cellulaire, où il peut contribuer à la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Thiele and Bernhagen, 2005).

Des études effectuées par Gore et al. (2008) avec des souris déficientes (KO) ont suggéré que le ligand CD74 est impliqué dans les réactions que mènent à la survie des cellules B d'une manière dépendante du CD44 (un composant intégral du complexe récepteur CD74). Ils ont reporté que la stimulation des cellules B par le MIF active les protéines de la famille akt, ce qui amène à une augmentation de la fonction de NF- κ B incluant une augmentation de l'expression de Bcl-X_L (Gore et al., 2008).

1.10.4 Le mécanisme d'action du MIF.

Le MIF exerce une action biologique par différents mécanismes (Calandra and Roger, 2003). D'un côté le MIF est impliqué dans la prolifération cellulaire, en se liant au CD74, ce qui amène une phosphorylation des protéines ERK1/ERK2, importantes pour activer les protéines de la famille ETS, et qui augmente l'activité du cPLA2, impliqué dans la production de protéines pro-inflammatoires, l'acide arachidonique, les prostaglandines et les leucotriènes. Le MIF a également été caractérisé comme activateur de la c-JUN Terminale kinase, la p38 MAPK (protéine kinase activée par les mitogènes) et le NF- κ B (facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B)). Néanmoins l'importance de ces interactions sur le système immunitaire n'est pas bien établie (Fig. 2.3).

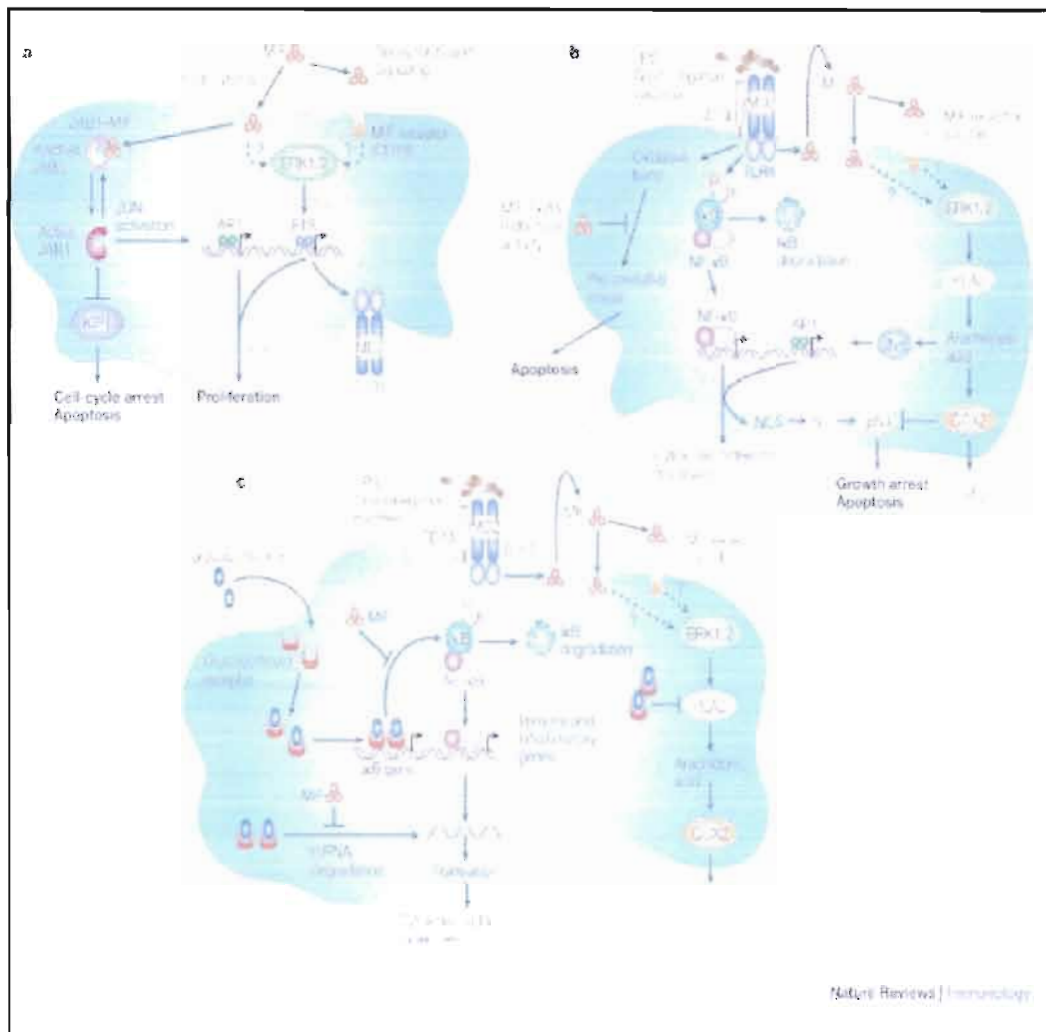


Figure 1.3. Mode d'action du MIF. Calandra, T. and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 791-800

1.11 Objectifs.

Comme nous avons déjà mentionné, les infections par *Plasmodium* génèrent deux effets importants chez les cellules B : leur activation polyclonale et leur apoptose.

Le MIF est une cytokine polyvalente, impliquée dans la survie des cellules B «*in vivo*» et son expression augmente dans le sérum des souris infectées par *Plasmodium* ainsi que chez les humains avec des infections sévères par *P. falciparum* (Martiney et al., 2000). Nous avons postulé que le MIF pourrait être impliqué dans l'activation polyclonale de cellules B et dans l'immunosuppression de la production des anticorps contre des antigènes hétérologues. Nous avons envisagé de:

- a. Mettre en évidence la suppression de la réponse d'anticorps durant l'infection par *P. c. adami* «*in vitro*» et «*in vivo*» en étudiant ses effets sur la réponse contre un antigène thymus-indépendant (LPS) «*in vitro*», et un antigène thymus-dépendant «*in vivo*». A cette fin, nous avons:
 - Établi un modèle d'immunisation qui donne une forte réponse de type Th2 en utilisant la γ -globuline humaine comme immunogène et le Titermak Gold (Sigma Aldrich) comme adjuvant.
 - Démontré la suppression des anticorps anti- γ globuline «*in vivo*» par l'infection.
- b. Évaluer l'effet de la neutralisation du MIF «*in vivo*» sur la réponse humorale contre la γ -globuline humaine chez des souris naïves et chez des souris infectées par *P. chabaudi*, ainsi que sur le développement d'une réponse Th1 (qui induit la production d'IFN- γ et qu'inhibe la production des anticorps). Nous avons:

- Évalué l'effet de la neutralisation du MIF sur la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par des lymphocytes spléniques en provenance de souris immunisées avec de la γ -globuline (avec ou sans infection) stimulés «*in vitro*» avec de la γ -globuline humaine.
- c. Étudier l'impact de la neutralisation du MIF sur la suppression de la réponse humorale spécifique durant l'infection.

CHAPITRE II

DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

2.1 Les souris.

Des souris femelles âgées de 6-8 semaines ont été obtenues de Charles River Laboratoires (Canada). Les souris ont été manipulées en suivant les régulations du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'UQAM.

2.2 Les infections des souris.

La souche non virulente, *Plasmodium chabaudi adami* DK a été utilisée lors des différentes expérimentations. Des échantillons de sang ont été prélevés quotidiennement à partir de la queue des souris pour la préparation des frottis sanguins. Les cellules ont été fixées au méthanol et colorées avec une solution 1:20 de Giemsa (Sigma Chemical, Montréal, Canada) durant 20 minutes. Le pourcentage de globules rouges parasités a été calculé suite à l'analyse par microscopie optique. Des prélèvements de sérum ont été faits à chaque 15 jour à partir de la veine saphène, et lorsque la parasitémie a été maximale, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane et le sang a été prélevé par ponction cardiaque.

2.3 Immunisations, effets de l'infection et de la neutralisation du MIF «*in vivo*».

Les souris ont été immunisées avec de la γ -globuline humaine (Sigma, St. Louis USA), 15 μ g/ souris/dose. Pour la première dose, la γ -globuline a été diluée en proportion 1 :1 dans l'adjuvant Titer Max Gold (SIGMA, St. Louis USA). Deux immunisations intra-péritonéales (ip) à un intervalle de 15 jours ont été effectuées.

Dans les expériences ayant pour objectif d'évaluer l'effet de l'infection sur la réponse d'anticorps dirigés contre la γ -globuline, trois groupes expérimentaux de 4 souris chacun ont été utilisés.

Pour le premier groupe, quatre souris ont été infectées avec 10^6 globules rouges parasités par la voie i.p. Lorsque la parasitémie a atteint un niveau d'infection de 10%, les souris ont été immunisées par la voie i.p avec de la γ -globuline humaine tel que décrit. Pour le deuxième groupe (groupe témoin), sans infection; les souris ont été également immunisées; et finalement pour le troisième groupe; les souris ont été infectées 15 jours après la deuxième immunisation. Lorsque la infection a été au maximale, les souris ont été sacrifiées.

Dans les expériences ayant pour objectif d'évaluer l'effet de la neutralisation du MIF «*in vivo*» sur la réponse d'anticorps anti- γ -globuline, un anticorps monoclonal anti-MIF, gracieusement donné par le Professeur Richard Bucala (Université de Yale, USA) a été administré par la voie ip. La neutralisation a été faite, en injectant 500 μ g d'anticorps monoclonal anti-MIF, 3 jours avant et 3 et 6 jours après l'immunisation avec la γ -globuline humaine. Dans les expériences ayant pour objectif d'évaluer l'effet de la neutralisation du MIF «*in vivo*» sur la suppression de la réponse par l'infection, 500 μ g d'anticorps monoclonal anti-MIF a été administré aux souris après la deuxième dose d'antigène (γ -globuline humaine). Cette neutralisation a été faite 3 jours avant l'infection par *P.c. adami* (10^6 parasites), le même jour de l'infection et 3 et 6 jours après l'infection. Lorsque la parasitémie a été maximale, les souris ont été euthanasiées.

2.4 Purification des cellules B et mesure de leur activité métabolique et prolifération suite à la stimulation «*in vitro*» par LPS.

Les cellules B ont été purifiées à partir de la rate de souris naïves et infectées, par sélection négative en suivant les recommandations du KIT de B cell purification (Easy Sep, Stem Cell, Vancouver, Canada). Les cellules ont été suspendues dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) supplémenté avec 10% Fœtal Bovine Serum (FBS), 0.05 mM B-mercaptoethanol (Sigma, Chemical, Montreal, Canada) et 100 U de pénicilline-streptomycine.

La viabilité et le nombre des cellules ont été vérifiées par coloration au bleu de tryptan (Sigma, Chemical, Montreal, Canada). Trois x 10⁵ cellules/ml ont été stimulées avec 5 et 10 µg de LPS (Sigma, Chemical, Montreal, Canada) et leur activité métabolique a été mesurée par l'ajout de 20 µl du réactif CellTiter 96[®] AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison US). Après 4 heures, l'absorbance a été mesurée à 490 nm.

Les cellules B ont été marquées avec du CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (Invitrogen, US) et leur prolifération a été induite par stimulation avec du lipopolysaccharide (LPS d'*E. coli*, Sigma Aldrich), ou par traitement avec un anticorps anti-CD40 (eBioscience, San Diego, CA, US) et de l'IL-4 (eBioscience, San Diego, CA, US), en présence de MIF recombinant (Biovision research, Mountain View, US) ou de l'anticorps monoclonal anti-MIF. Les cellules ont été incubées pendant 72 heures. L'index de prolifération a été calculé avec le logiciel Modfit, suite à l'acquisition des données par le BD FACSCalibur. Flow Cytometer System (BD Biosciences, US).

2.5 La détection d'IgG, IgG1 ET IgG2a à partir du sérum.

L'ELISA a été utilisée pour déterminer le titre d'anticorps anti γ -globuline dans le sérum. Des plaques de 96 puits (Nunc-Immuno, Rochester, NY. US) ont été traitées pendant la nuit à 4° C avec 100 μ l d'une solution à 30 μ g/ml de γ -globuline humaine dans du Tampon bicarbonate 0.1 M (pH 9.6). Le jour suivant, les puits ont été bloqués avec 200 μ l de PBS-10% FBS pour 2 heures à 37°C. Des dilutions sériées de sérum ont été ajoutées (100 μ l) et les plaques ont été incubées durant 2 heures à 37°C. Ensuite, un anticorps secondaire anti-IgG de souris(100 μ l) a été ajouté (1 :3000 dans 1% FBS-PBS). Les plaques ont été incubées pendant une heure à 37°C et après quatre lavages, une dilution de Horseradish peroxidase (HPR) a été ajoutée (100 μ l; 1 :1000 1% FBS-PBS) pendant 45 min à 37°C. Finalement, le substrat 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (100 μ l) a été ajouté, et la réaction a été révélée à la noirceur durant 25 min pour ensuite être arrêtée avec de H₂SO₄ 0.2M.

Pour les IgG1 et IgG2, des anticorps spécifiques anti-IgG de souris biotinylés (eBioscience, San Diego, CA. US) ont été utilisés. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 μ l d'une solution de H₂SO₄ 0.2 M. La lecture a été faite à une absorbance de 450 nm. Les titres d'anticorps spécifiques ont été calculés en déterminant la plus haute dilution à laquelle l'absorbance mesurée représentait le double de celle du sérum pré-immun.

2.6 La culture des cellules spléniques «in vitro».

Les cellules spléniques en provenance de souris immunisées et neutralisées avec l'anticorps monoclonal anti-MIF ont été isolées et mises en plaque (24 puits) à raison de 3x10⁶ cellules par puits. Les cellules ont ensuite été stimulées avec 15 μ g/ml de γ -globuline humaine à 37°C et 5% CO₂ durant 72 heures. Les surnageant ont été récupérés et conservés à -20°C pour des analyses ultérieures.

La concentration d'IFN- γ dans les surnageant a été déterminée par ELISA. Des plaques ont été traitées toute la nuit (4°C) avec 50 μ l d'anticorps monoclonal anti-IFN- γ , dilué 1 :1000 dans 50 mM de tampon bicarbonate pH 9.6 (Sigma Chemicals, Montreal, Canada). Les plaques ont été lavées avec 0.05% Tween 20 dans du PBS et bloquées durant une heure à 37 °C avec 100 μ l de PBS contenant 10% de FBS. Après quatre lavages, 100 μ l de surnageant ont été ajoutés a chaque puits et incubés pendant une heure. Un anticorps monoclonal biotinylé anti-IFN- γ a été ajouté (dilution 1 :1000, 100 μ l par puit) et a été incubé à 37°C durant une heure. Ensuite, une solution de streptavidine-peroxidase a été ajoutée (1 :2000 dans du PBS 1% FBS) pendant 45 min à température pièce. Suite à 7 lavages, le substrat TMB a permis la détection des complexes formés. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 μ l de H₂SO₄ 0.2M, et l'absorbance a été mesurée à 450nm.

Les concentrations d'IFN- γ ont été calculées à l'aide d'une courbe standard générée avec de l'IFN- γ recombinant en pg/ml.

2.7 Évaluation de l'apoptose des cellules B.

Des cellules spléniques en provenance des différents groupes de souris ont été isolées, et 10⁶ cellules de chaque souris ont été marquées avec 1 μ g/ml d'anticorps anti-B220 couplé à FITC, 1 μ g/ml de Iodure de propidium (IP) et 1 μ g/ml d'annexin V couplé à APC. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un FACSCalibur et du logiciel CellQuest.

2.8 L'analyse des résultats.

La comparaison des titres d'anticorps entre le groupe témoin et le groupe immunisé et/ou neutralisé avec l'anticorps monoclonal anti-MIF a été analysée par un test t de Student. La comparaison des groupes entre eux a été réalisée à l'aide du test

paramétrique Turkey. Le logiciel Graph Pad Prism a été utilisé et des valeurs de $P < 0.05$ ont été considérées comme significatives.

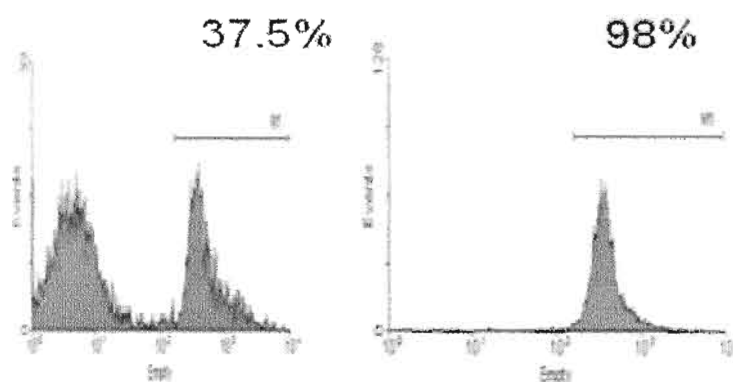
CHAPITRE III

RÉSULTATS

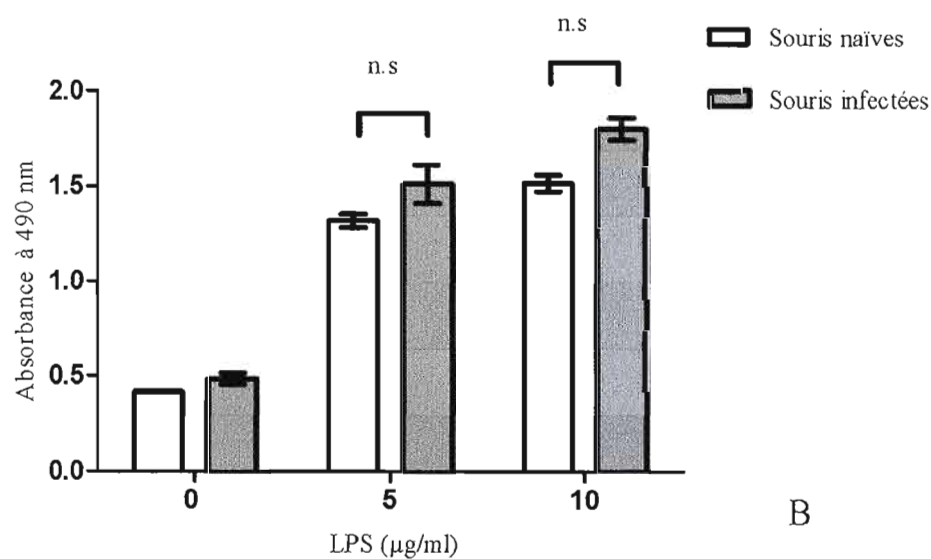
3.1 Effet de l'infection par *Plasmodium* sur la purification de cellules B et mesure de l'activité métabolique des lymphocytes B suite à une stimulation par un antigène thymus-indépendant.

En premier lieu, nous avons déterminé si l'infection par *Plasmodium* altérerait la réponse des cellules B contre un antigène thymus-indépendant, le LPS. Puisque le LPS ne peut être administré *in vivo* en raison de sa toxicité, la fonction des cellules B a été caractérisée à partir de cellules isolées de souris infectées.

Des cellules B de souris naïves ou infectées par *P.c. adami* ont été purifiées par triage magnétique (Fig 3.1 A), et mises en culture pendant 24 heures en présence des différentes concentrations de LPS. Leur activité métabolique (indice de prolifération) a ensuite été analysée. Les résultats montrent que l'infection par *P. c. adami* n'altère pas d'une manière significative l'activité métabolique des cellules CD19⁺ (cellules B) en réponse au LPS (Fig 3.1.B) et donc, ne semble pas modifier leur capacité à répondre à un antigène thymus-indépendant.



A



B

Fig. 3.1 Activité métabolique des cellules B de souris infectées par *P.c.adami* DK. (A). Profil de purification des cellules B montrant 98 % de pureté suite au marquage avec un anticorps anti-CD19. (B) Activité métabolique des cellules B induite par un traitement avec du LPS pendant 72 heures, en utilisant le réactif MT-PMS. (n.s). Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Il n'y avait pas de différence significative ($p > 0.05$).

3.2 Effet de l'infection par *P. c. adami* sur la réponse primaire d'anticorps contre la γ -globuline humaine.

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'effet de l'infection par *Plasmodium* sur la capacité des souris à développer des anticorps en réponse à un antigène thymo-dépendant, la γ -globuline humaine. L'activation des cellules B par la γ -globuline humaine, à la différence du LPS, nécessite la coopération des cellules T CD4+ auxiliaires (helper) qui fournissent la co-stimulation nécessaire pour la production des anticorps solubles spécifiques. Nous avons ciblés les IgG totaux et les IgG1, normalement secrétées suite à la commutation de classes (d'IgM à IgG). Nos résultats ont montré une légère augmentation du titre d'anticorps contre la γ -globuline humaine chez les souris infectées qui ont reçu une seule dose d'antigène au pic de parasitémie (réponse primaire) mais qui n'était pas cependant significative (Fig. 3.2 A). Une tendance comparable a été observée lorsque les titres des IgG1 sériques spécifiques ont été mesurés (Fig. 3.2 B). Tel qu'attendu pour l'immunisation avec une protéine soluble, les titres des IgG2a spécifiques à la γ -globuline étaient très faibles suite à leur détection par ELISA (résultats non montrés).

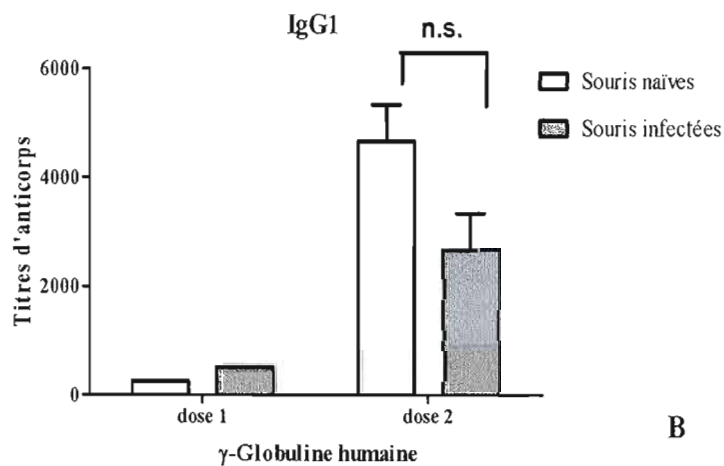
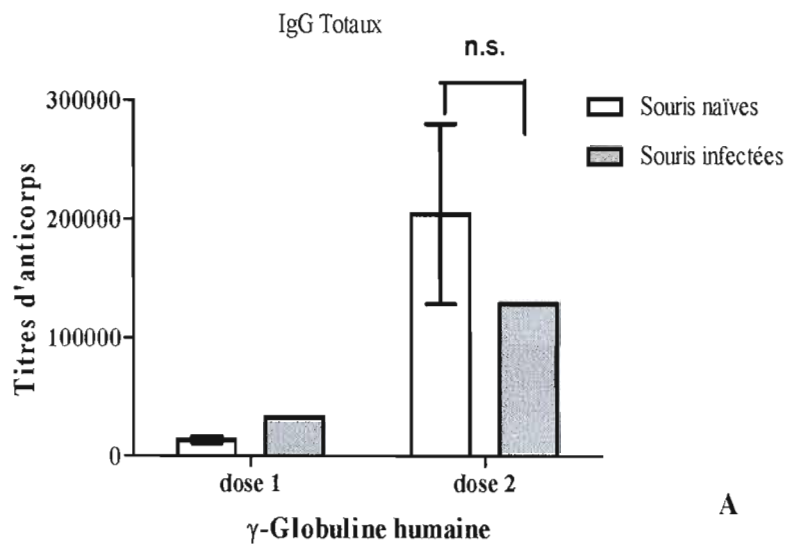


Fig.3.2 Titres d'IgG totaux et IgG1 spécifiques à la γ -globuline humaine chez des souris infectées avant immunisation. Des ELISAs ont été effectués pour déterminer les titres d'IgG (A) et d'IgG1 (B). Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Il n'y avait pas une différence significative entre les groupes évalués. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed.

3.3 Effet de l'infection par *P. c. adami* DK sur la réponse secondaire d'anticorps contre la γ -globuline humaine.

Nos avons ensuite étudié l'effet de l'infection sur une réponse secondaire d'anticorps déjà établie, en infectant les souris après une immunisation avec deux doses de γ -globuline humaine comme antigène. Les résultats montrent une diminution significative du titre d'anticorps chez les souris infectées après avoir reçu la deuxième dose de γ -globuline (réponse secondaire) (Fig.3.3 A). Une tendance comparable a été observée lorsque les IgG1 ont été mesurés (Fig. 3.3B).

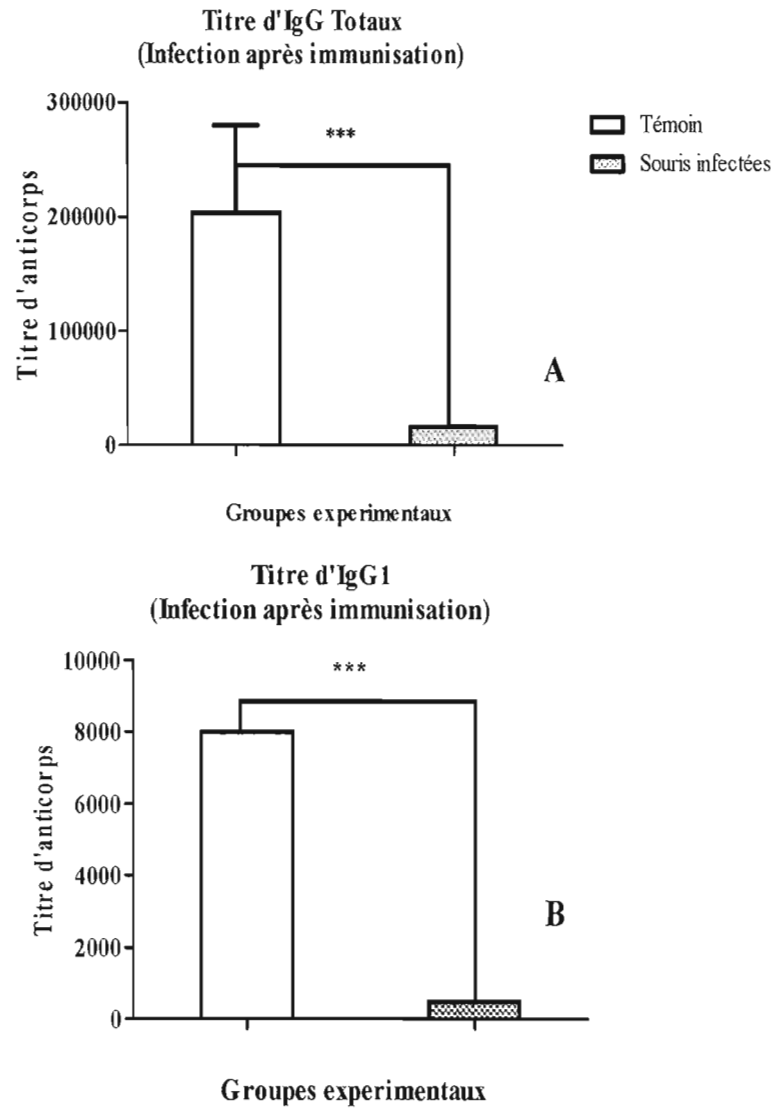


Fig.3.3 Titre d'IgG totaux (A) et d'IgG1 (B) spécifiques à la γ -globuline humaine chez des souris infectées par *P.c. adami* après l'immunisation. Quatre souris par groupe ont été évalué. Un tests ELISAs ont été effectués pour mesurer les titres d'IgG dans le sérum des souris. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. (***) $p < 0.001$.

3.4 Effet d'anticorps monoclonaux anti-MIF sur la prolifération des cellules spléniques.

Bélanger B. (2008) a reporté une sécrétion accrue de MIF chez des souris infectées par *P.c. adami* (Bélanger, 2008). Le MIF semble favoriser le développement d'une réponse de type Th2, caractérisée par la production d'IgG1 (Leng et al., 2003), et exercer aussi une action anti-apoptotique sur les cellules B (Gore et al., 2008).

Nous avons postulé que la forte sécrétion de MIF durant l'infection pourrait contribuer au dérèglement de la réponse des cellules B observée durant l'infection, en favorisant l'activation polyclonale non spécifique des cellules B, et en conséquence, la déviation de la réponse immune (perte d'anticorps spécifiques)

D'abord, le rôle du MIF dans la réponse à l'immunisation par la γ -globuline a été évalué de façon indirecte, en traitant les souris avec un anticorps neutralisant le MIF. Ce traitement a été effectué durant la période d'immunisation, et son impact a été ensuite évalué *in vitro* en mesurant la sécrétion d'IFN- γ et la prolifération des cellules spléniques suite à leur stimulation avec de la γ -globuline. (voir méthodologie, chapitre II)

Une prolifération basale plus élevée, révélée par une activité métabolique accrue, a été observée chez les cellules spléniques en provenance des souris traitées avec l'anti-MIF, et ce, en absence de stimulation (Fig. 3.4 $p < 0.05$). De plus, une diminution de la prolifération suite à la stimulation avec la γ -globuline humaine a été notée par rapport au témoin (Fig. 3.4).

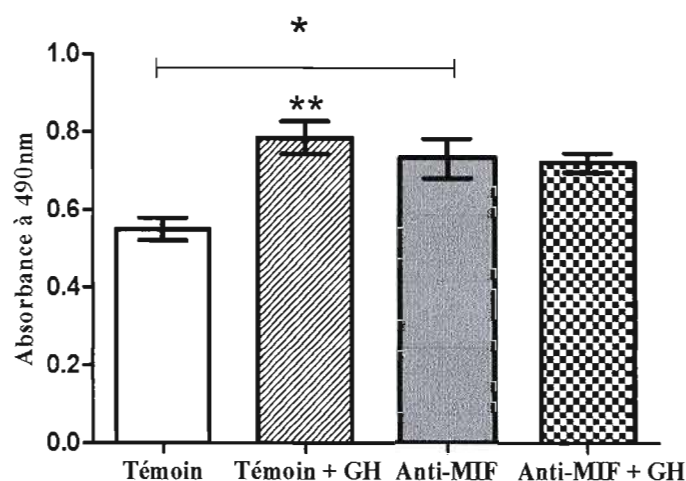


Fig. 3.4 Analyse de la prolifération de cellules spléniques isolées de souris neutralisées avec un anticorps anti-MIF. Des cellules spléniques ont été isolées et incubées pendant 72 hrs en absence ou en présence de γ -globuline humaine (GH). Le MTS-PMS a été utilisé comme indicateur de prolifération cellulaire. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed (*) $p < 0.05$ (**) $p < 0.01$, différente significativement.

Nous avons aussi caractérisé l'effet de l'anticorps anti-MIF sur la sécrétion d'IFN- γ , une cytokine de type Th1, qui inhibe la production d'anticorps (IgG1) en favorisant le développement d'une réponse de type cellulaire (Kidd, 2003). Les cellules spléniques ont été isolées des souris immunisées ayant subi ou non un traitement avec l'anticorps anti-MIF *in vivo* et la production d'IFN- γ a été mesurée par le test ELISA dans les surnageant de culture suite à une stimulation avec de la γ -globuline durant 72 heures. En accord avec notre hypothèse, une production accrue d'IFN- γ ($P < 0.05$, Fig. 3.5) a été révélée chez les cellules spléniques isolées à partir des souris ayant reçu l'anti-MIF.

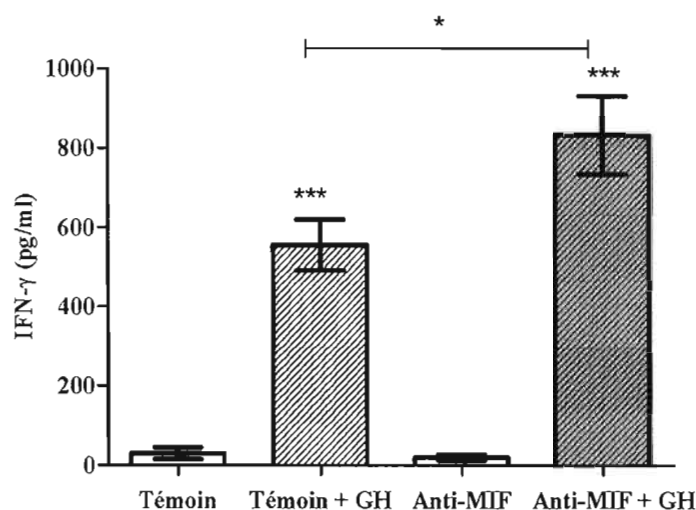


Fig. 3.5 Production d'IFN- γ par les cellules spléniques en provenance de souris contrôles ou traitées avec l'anticorps anti-MIF *in vivo* durant l'immunisation avec la γ -Globuline. Des cellules spléniques ont été isolées et incubées pendant 72 hrs en absence ou de présence de γ -globuline humaine (GH). Un test ELISA a été utilisé pour mesurer la concentration d'IFN- γ . Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. (***) $p < 0.001$ (*) $p < 0.05$.

Ces résultats montrent que la neutralisation du MIF durant l'immunisation semble renforcer le développement d'une réponse de type Th1. En théorie, ces changements pourraient avoir un impact sur la réponse d'anticorps anti- γ -globuline, étant donné que l'IFN- γ est antagoniste de la production d'IL-4 et donc est défavorable à l'induction d'une réponse d'anticorps de type Th2.

3.5 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse d'anticorps IgG totaux contre *P. chabaudi adami* (antigène homologue).

L'effet de la neutralisation du MIF sur la réponse d'anticorps contre des antigènes parasites a été étudié. Étant donné que l'IFN- γ est connu pour moduler la production d'IgG, nous avons évalué l'impact du MIF sur la réponse humorale contre des antigènes homologues. Nous avons travaillé avec trois groupes de souris : le premier groupe a été le témoin, le deuxième groupe a été traité avec l'anti-MIF suivi d'une infection par *P. c. adami*, et le troisième groupe qui a seulement été infecté par *P. c. adami*. Des souris ont été neutralisées. Les résultats montrent une faible inhibition de la réponse sérologique anti-*Plasmodium* suite à la neutralisation du MIF, laquelle n'est pas statistiquement significative.

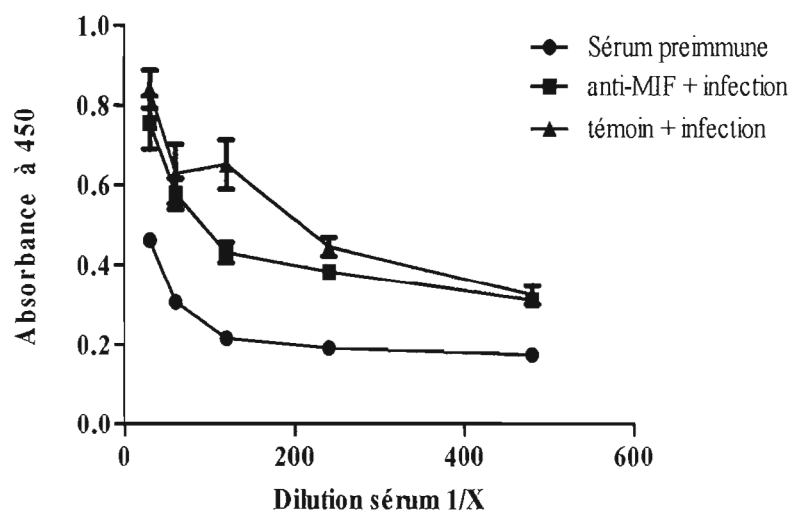


Fig. 3.6. Anticorps IgG contre *P. chabaudi adami* DK chez de souris traitées avec l'anticorps anti-MIF. Un test ELISA a été effectué pour déterminer la réponse d'anticorps IgG totaux. Quatre souris par groupe ont été évaluées. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes évalués.

3.6 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse IgG contre la γ -globuline humaine.

Étant donné que le MIF semble avoir un rôle important dans la survie des cellules B (Gore et al., 2008), et que sa neutralisation possède un effet négatif sur la production d'anticorps (Bernhagen et al., 1998), nous avons évalué si la neutralisation du MIF affectait la réponse déjà établie des anticorps spécifiques contre la γ -globuline. La neutralisation a été effectuée 3 jours avant et 3 et 6 jours après l'immunisation avec de la γ -globuline humaine.

Contrairement à ce qui était attendu, la neutralisation de MIF durant l'immunisation n'a pas inhibé la production d'anticorps anti- γ -globuline. Au contraire, une tendance à la hausse a été observée, mais sans être significative (Fig. 3.7).

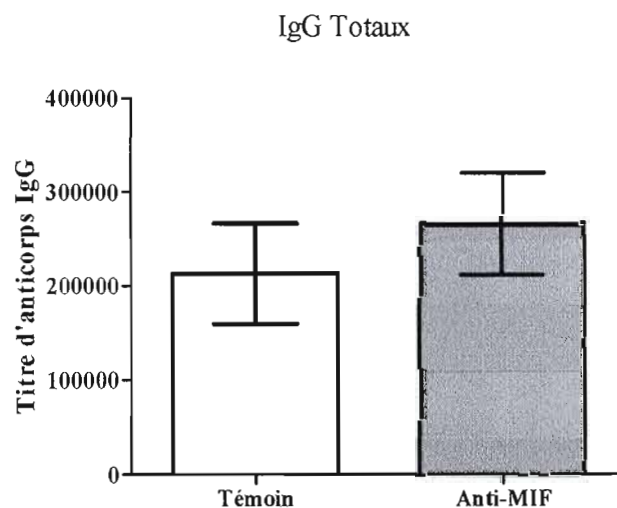


Fig. 3.7 Titre d'anticorps IgG totaux anti- γ -globuline humaine chez des souris naïves et traitées avec un anticorps anti MIF. Un test ELISA a été effectué pour déterminer la réponse d'anticorps IgG totaux. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes évalués.

3.7 Effet de la neutralisation du MIF sur la réponse IgG contre la γ -globuline humaine après l'infection par *P. chabaudi adami* DK (antigène hétérologue).

Étant donné que les infections par *Plasmodium* inhibent les réponses anticorps déjà établies, nous avons évalué le possible rôle du MIF dans ce processus en le neutralisant chez des souris après une immunisation avec deux doses d'antigène (γ -globuline humaine). Cette neutralisation a été réalisée 3 jours avant l'infection par *P.c. adami* (10^6 parasites), le jour de l'infection et 3 et 6 jours après l'infection. Au pic de la parasitémie, les souris ont été euthanasiées. Les taux d'anticorps IgG totaux ont été évalués dans le sérum par un test ELISA. Les résultats montrent que la neutralisation du MIF n'affecte pas la production d'anticorps contre un antigène hétérologue après une infection par *P.c.adami* (Fig. 3.8).

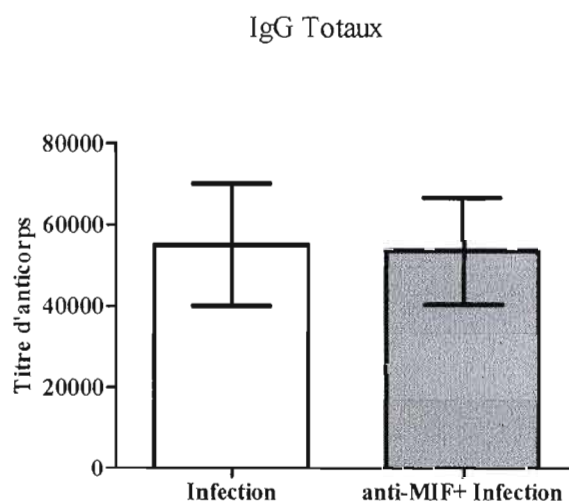


Fig. 3.8 Titre d'anticorps IgG totaux chez des souris infectées avec *P.c. adami* et traitées avec un anticorps anti MIF. Un test ELISA a été utilisé pour déterminer le titre d'anticorps. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. Il n'y avait pas de différence significative entre les groupes évalués.

3.8 Effet de la neutralisation du MIF sur l'apoptose des cellules B.

Le MIF a été caractérisé comme un facteur impliqué dans la survie des cellules B *in vitro*. Dû au fait que l'exposition aux antigènes entraîne l'activation des cellules B, nous avons vérifié l'impact du MIF sur la survie des cellules B activées *in vivo*. La viabilité des cellules B provenant de souris immunisées avec la γ -globuline humaine et neutralisées ou non avec l'anti-MIF a été analysée en cytométrie.

Les cellules spléniques ont été marquées avec un anticorps anti-B220, de l'annexin V et l'iodure de propidium (PI). Des analyses ont été effectuées pour déterminer le pourcentage de cellules B annexin⁺ et/ou PI⁺. Nos résultats indiquent qu'en neutralisant le MIF, une légère diminution non significative du pourcentage de cellules B 220⁺ annexin⁺ a été observée (Fig. 3.9 B), suggérant un possible effet pro-apoptotique pour le MIF. De la même manière, les cellules B 220⁺ nécrotiques (PI⁺) montrent également une tendance à la diminution (Fig 3.9 A).

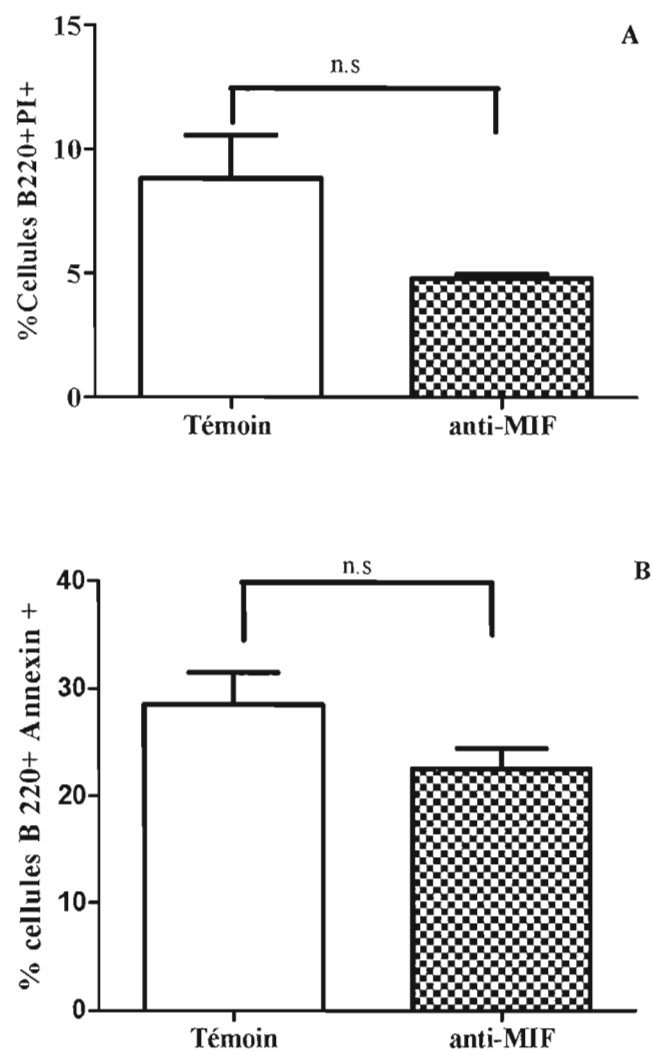


Fig. 3.9. Effet de la neutralisation du MIF sur l'apoptose et la nécrose des cellules B 220⁺. Des doubles marquages avec l'anticorps anti-B220 (FITC) et le PI (A) ou l'annexin V (B) ont été réalisés chez les cellules spléniques. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux en utilisant le logiciel CellQuest. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. Il n'y avait pas une différence significative entre les deux groupes.

Suite aux résultats, des souris ont été traitées avec l'anti-MIF avant et après une infection par *P. c. adami*, dans le but de savoir si le MIF, augmentant pendant l'infection, est impliqué dans la chute d'anticorps contre des antigènes hétérologues.

Les résultats montrent une diminution de cellules B PI⁺ (cellules B nécrotiques) dans les groupes de souris traitées, suggérant que le MIF puisse être impliqué dans le processus de mort des cellules B 220⁺ consécutive à l'infection par *Plasmodium*.

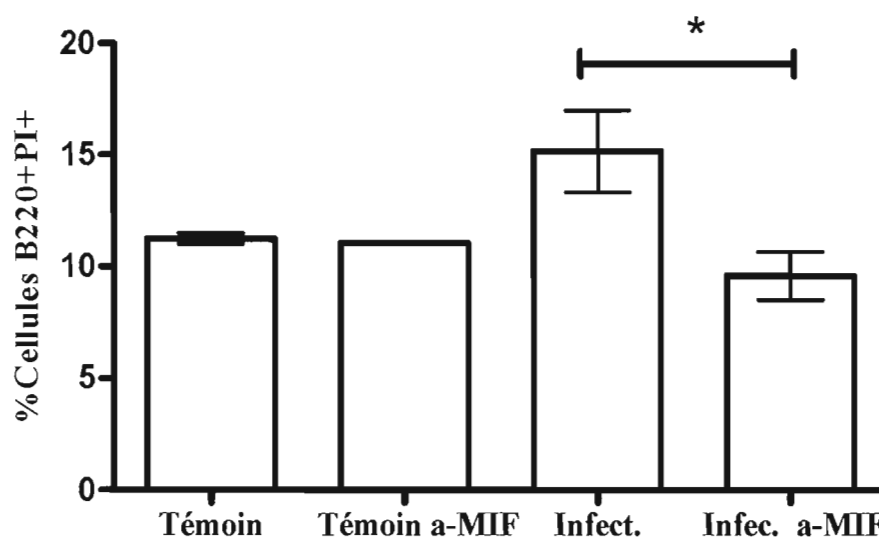


Fig. 3.10 Mortalité des cellules B 220⁺ après une infection par *P.c. adami*. Les cellules spléniques des souris non traitées et traitées avec l'anticorps anti-MIF ont été isolées. Un double marquage avec l'anticorps anti-B220 (FITC) et le PI a été réalisé chez les cellules spléniques. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux en utilisant le logiciel CellQuest. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. (*) $p < 0.05$.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les infections par *Plasmodium* induisent des modifications fonctionnelles importantes du système immunitaire. La malaria est associée à une susceptibilité aux salmonelloses et aux autres infections bactériennes et à la réactivation des infections virales par *Herpes zoster*, *H. simplex* et le virus Epstein Barr, mais les mécanismes par lesquelles le parasite supprime les réponses immunitaires déjà établies (lymphocytes de mémoire et effecteurs) sont encore inconnus (Cook, 1985; Whittle et al., 1990; Whittle et al., 1984).

La sécrétion d'anticorps par les cellules B joue un rôle important dans la protection de l'hôte contre des pathogènes extracellulaires et intracellulaires. Néanmoins, nos résultats et des nombreuses études démontrent que durant l'infection par *Plasmodium*, la réponse d'anticorps aux immunisations avec des antigènes non-malariques est inhibée. Des enfants infectés par *Plasmodium* ont des réponses humorales contre la toxine tétanique et l'antigène « O » de *Salmonella* supprimées. En plus, les patients répondent moins bien aux vaccins et deviennent susceptibles aux infections normalement contrôlées par les anticorps. Ces études suggèrent que la malaria inhibe la réponse protectrice conférée par les anticorps (Greenwood et al., 1972; Mabey et al., 1987; Millington et al., 2006; Stephens and Langhorne, 2006).

Millington et al. (2006) ont suggéré que la suppression immunitaire causée par *Plasmodium* affecte différentes populations cellulaires et que la maturation et fonction des cellules dendritiques est altérée par l'ingestion du pigment malarique (hemozoïne). En conséquence, une fois activées, les cellules T CD4⁺ spécifiques à des antigènes hétérologues perdent leur capacité de migrer à la rencontre des cellules

B, lesquelles perdent à leur tour la capacité de proliférer et de produire des anticorps (Millington et al., 2006).

Dans notre laboratoire, nous avons également démontré une expansion significative des cellules T régulatrices ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) pendant les infections par *P. c. adami* (Cambos et al., 2008). Cette population des cellules a été suggérée comme responsable de la diminution de la réponse immunitaire humorale contre des antigènes exogènes (Eddahri et al., 2006). Néanmoins, Il reste encore à établir si une corrélation existe entre les cellules T régulatrices et la diminution de la réponse humorale pendant la malaria. Dans ce contexte, une controverse existe concernant les effets de la déplétion des cellules T régulatrices sur la production d'anticorps. Ainsi, Lee et al (2005) ont reporté que la déplétion de cellules T régulatrices ne affecte pas la réponse humorale contre des polysaccharides et des protéines durant une infection par *Streptococcus pneumoniae*. Lim et al, (2005) ont reporté que les cellules T régulatrices suppriment les cellules B sans supprimer la réponse Th1, et Eddahri et al, (2005) ont montrées que les cellules T régulatrices suppriment la production des anticorps par les cellules B «*in vitro*» en inhibant les cellules T $CD4^+CD25^-$ (Eddahri et al., 2006; Lee et al., 2005; Lim et al., 2005).

Différentes études ont également suggéré que l'activation polyclonale non spécifique des cellules B durant l'infection par *Plasmodium* est associée à des pathologies chez l'hôte, dont l'augmentation de des cellules dans les organes secondaires (splénomégalie et lymphoadénopathie), et la production d'anticorps auto-réactifs (hypergammaglobulinémie) avec différentes spécificités, mais il n'est pas connu à ce jour si le parasite est impliqué dans la stimulation de ces activités (Greenwood, 1974; Lima et al., 1991; Reina-San-Martin et al., 2000).

Malgré l'augmentation marquée de cellules B matures et productrices d'anticorps pendant les infections par *Plasmodium*, une diminution des anticorps déjà existants contre des antigènes hétérologues a été démontrée. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cette déficience, et l'augmentation du catabolisme des IgG a été suggérée, en partie comme stratégie pour préserver des niveaux normaux d'IgG en circulation. En conséquence, il y a une diminution d'anticorps spécifiques suite à l'infection par *Plasmodium* où l'augmentation des IgG non spécifiques ou auto-réactives est induite (Sardinha et al., 2002). En diminuant les niveaux d'IgG contre des antigènes dérivés, entre autres, des vaccins par un phénomène d'immuno-déviations, *Plasmodium* peut occasionner de sévères problèmes de santé publique surtout dans des pays où la maladie est endémique.

Malgré la diminution des titres d'anticorps préétablies contre des antigènes hétérologues, les infections par *Plasmodium* sont également connues pour entraîner une activation polyclonale non spécifique de cellules B. Cette activation peut impliquer des molécules associées au parasite ou des mécanismes indirects (Montes et al., 2007)

Il a été suggéré que le MIF pouvait agir comme élément clé dans différentes maladies infectieuses. Dans notre laboratoire, une production accrue de MIF a été observée chez des souris infectées par *Plasmodium*, en accord avec d'autres études (Martiney et al., 2000). Le MIF a été impliqué dans la réponse d'anticorps (Bernhagen et al., 1998) et aussi dans la prolifération et la survie des cellules B en diminuant leur apoptose et en favorisant leur activation (Gore et al., 2008).

En utilisant un modèle d'immunisation avec la γ -globuline humaine, caractérisée par une forte réponse humorale du type Th2, suivi d'une infection par *P.c. adami*, qui

cause une splénomégalie, nous avons démontré que l'infection diminue la réponse d'anticorps préétablie.

Malgré le fait que différentes études ont démontré que le MIF était impliqué dans l'activation des cellules B et possédait des propriétés anti-apoptotique «*in vitro*», notre étude «*in vivo*» ne semble pas révéler une participation essentielle du MIF dans l'activation polyclonale des cellules B ni même dans la production d'anticorps, et ceci en absence ou présence d'infection. Le MIF peut jouer différents rôles dans l'immunité mais ne semble pas être directement impliqué dans les voies de signalisation qui mènent à l'activation du Facteur activateur des cellules B (BAFF), lesquelles sont importantes pour l'expansion des cellules B (Montes et al., 2007).

Par ailleurs, nos résultats montrent que la neutralisation du MIF diminue le pourcentage de cellules B nécrotiques et/ou apoptotiques, ce qui diffère des résultats publiés par Gore et al (2008) et Starlets et al (2006) qui ont montré une augmentation de l'expression de Bcl-X_L chez les cellules B exposée à du MIF recombinant *in vitro*.

En conclusion, nos résultats ne suggèrent pas l'implication du MIF dans l'inhibition de la réponse humorale préétablie durant les infections par *Plasmodium*. Comme nous l'avons déjà mentionné, les niveaux d'IgGs sériques doivent être contrôlés par l'hôte et le fait que l'infection par *Plasmodium* génère une hyperglobulinémie peut, à son tour, diminuer la quantité d'anticorps préexistants. Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser l'expression du récepteur néonatal Fc (FcRn), impliqué dans la régulation du temps de vie moyen des IgGs (Chaudhury et al., 2003), pendant les infections par *Plasmodium* et les cellules T régulatrices. Le FcRn est un hétérodimère exprimé dans différents organes comme le foie, les reins etc. et aussi chez les monocytes, macrophages et cellules dendritiques (Zhu et al., 2001). La liaison des IgG à FcRn requiert un contact entre les résidus CH2 et CH3 du domaine de la

fraction constante de l'IgG et les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du FcRn. Le rôle de cette liaison est essentiel pour le métabolisme des IgG. Nous suggérons que les infections par *Plasmodium* pourraient moduler l'expression de FcRn en réponse à une augmentation importante des niveaux d'IgG (Cervenak and Kacskovics, 2009).

Un autre aspect important à considérer par rapport au MIF et les cellules B pendant les infections par *Plasmodium* est la molécule CD74, qui a été proposée comme récepteur du MIF chez les cellules B, menant à leur prolifération et leur survie. En effet, étant donné que le MIF augmente durant les infections par *Plasmodium*, il est probable que son récepteur, la molécule CD74, soit aussi modulé par l'infection.

Il reste également à évaluer la présence et le rôle de la molécule CD44 lors des infections par *Plasmodium*, étant donné qu'il a été suggéré que cette molécule peut agir comme initiateur de la cascade menant à la prolifération des cellules B. En effet, Gore et al, 2008 ont démontré que le MIF induit la activation de NF- κ B et la prolifération des cellules B, lesquelles entrent à la phase S du cycle cellulaire d'une manière dépendant du complexe CD74/CD44 (Gore et al., 2008).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les infections par *Plasmodium* modulent la réponse immunitaire cellulaire et humorale en diminuant les titres d'anticorps contre des immunisations déjà effectuées. Le mécanisme par lequel les anticorps sont diminués n'est pas encore connu. Dans ce contexte, l'évaluation du temps de demi-vie des anticorps s'avère pertinente de même que l'expression du récepteur néonatal Fc (FcRn) qui est impliqué dans l'internalisation des anticorps et leur protection contre la dégradation. L'évaluation des cellules régulatrices $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ semble également être un chemin important pour élucider la performance des cellules B comme productrices des anticorps pendant les infections par *Plasmodium*.

Des études *in vitro* ont suggéré que l'action du MIF chez les cellules B nécessitait sa liaison aux récepteurs CD74 et CD44. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact d'une infection par *Plasmodium* sur cette interaction.

Malgré que certaines études aient rapporté que le MIF pourrait jouer en rôle dans la production d'anticorps, nos résultats indiquent que le MIF n'altère pas significativement la réponse d'anticorps lors d'un protocole de neutralisation durant l'immunisation. Nos résultats excluent la participation du MIF dans l'activation polyclonale non spécifique des cellules B pendant les infections par *Plasmodium*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- Ahvazi, B.C., Jacobs, P., and Stevenson, M.M. (1995). Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *J Leukoc Biol* 58, 23-31.
- Akdis, C.A., and Blaser, K. (1999). IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J* 13, 603-609.
- Artavanis-Tsakonas, K., Tongren, J.E., and Riley, E.M. (2003). The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol* 133, 145-152.
- Austyn, J.M. (2000). Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 162, S146-150.
- Awandare, G.A., Ouma, Y., Ouma, C., Were, T., Otieno, R., Keller, C.C., Davenport, G.C., Hittner, J.B., Vulule, J., Ferrell, R., *et al.* (2007). Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect Immun* 75, 201-210.
- Bates, I., and Bedu-Addo, G. (1997). Chronic malaria and splenic lymphoma: clues to understanding lymphoma evolution. *Leukemia* 11, 2162-2167.
- Becker, C., Stoll, S., Bopp, T., Schmitt, E., and Jonuleit, H. (2006). Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol* 195, 113-124.
- Bélanger, B. (2008). La neutralisation du facteur d'inhibition de migration de macrophages (MIF) augmente la sécrétion du TNF- α et module la sécrétion d'IFN- γ durant l'infection par *Plasmodium chabaudi adami*. (Montréal, UQAM).
- Bernhagen, J., Calandra, T., and Bucala, R. (1998). Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J Mol Med* 76, 151-161.
- Bruce, M.C., Alano, P., Duthie, S., and Carter, R. (1990). Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. *Parasitology* 100 Pt 2, 191-200.
- Bucala, R. (2007). MIF : most interesting factor (Hackensack, NJ: World Scientific).
- Calandra, T., Froidevaux, C., Martin, C., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis. *J Infect Dis* 187 Suppl 2, S385-390.
- Calandra, T., and Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 791-800.
- Cambos, M., Belanger, B., Jacques, A., Roulet, A., and Scorza, T. (2008). Natural regulatory (CD4+CD25+FOXP+) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi adami* infection and do not contribute to immune evasion. *Int J Parasitol* 38, 229-238.
- Casals-Pascual, C., Kai, O., Cheung, J.O., Williams, S., Lowe, B., Nyanoti, M., Williams, T.N., Maitland, K., Molyneux, M., Newton, C.R., *et al.* (2006). Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* 108, 2569-2577.

- Cervenak, J., and Kacskovics, I. (2009). The neonatal Fc receptor plays a crucial role in the metabolism of IgG in livestock animals. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 171-177.
- Clark, I.A. (1987). Cell-mediated immunity in protection and pathology of malaria. *Parasitol Today* 3, 300-305.
- Clark, I.A., al Yaman, F.M., and Jacobson, L.S. (1997). The biological basis of malarial disease. *Int J Parasitol* 27, 1237-1249.
- Cook, I.F. (1985). Herpes zoster in children following malaria. *J Trop Med Hyg* 88, 261-264.
- Crabb, B.S., and Beeson, J.G. (2005). Promising functional readouts of immunity in a blood-stage malaria vaccine trial. *PLoS Med* 2, e380.
- Daily, J.P. (2006). Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *J Clin Pharmacol* 46, 1487-1497.
- Deans, J.A., and Cohen, S. (1983). Immunology of malaria. *Annu Rev Microbiol* 37, 25-49.
- Donati, D., Zhang, L.P., Chene, A., Chen, Q., Flick, K., Nystrom, M., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2004). Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 72, 5412-5418.
- Doolan, D.L., Dobano, C., and Baird, J.K. (2009). Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev* 22, 13-36, Table of Contents.
- Eddahri, F., Oldenhove, G., Denanglaire, S., Urbain, J., Leo, O., and Andris, F. (2006). CD4+ CD25+ regulatory T cells control the magnitude of T-dependent humoral immune responses to exogenous antigens. *Eur J Immunol* 36, 855-863.
- Engwerda, C.R., Mynott, T.L., Sawhney, S., De Souza, J.B., Bickle, Q.D., and Kaye, P.M. (2002). Locally up-regulated lymphotoxin alpha, not systemic tumor necrosis factor alpha, is the principle mediator of murine cerebral malaria. *J Exp Med* 195, 1371-1377.
- Franke-Fayard, B., Janse, C.J., Cunha-Rodrigues, M., Ramesar, J., Buscher, P., Que, I., Lowik, C., Voshol, P.J., den Boer, M.A., van Duinen, S.G., *et al.* (2005). Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11468-11473.
- Good, M.F. (2001). Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol* 1, 117-125.
- Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R., and Shachar, I. (2008). Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem* 283, 2784-2792.
- Goumard, P., Vu Dac, N., Maurois, P., and Camus, D. (1982). Influence of malaria on a pre-existing antibody response to heterologous antigens. *Ann Immunol (Paris)* 133D, 313-326.
- Greenwood, B.M. (1974). Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinaemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet* 1, 435-436.
- Greenwood, B.M., Bradley-Moore, A.M., Bryceson, A.D., and Palit, A. (1972). Immunosuppression in children with malaria. *Lancet* 1, 169-172.
- Greenwood, B.M., Playfair, J.H., and Torrigiani, G. (1971). Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics. *Clin Exp Immunol* 8, 467-478.
- Greenwood, B.M., Stratton, D., Williamson, W.A., and Mohammed, I. (1978). A study of the role of immunological factors in the pathogenesis of the anaemia of acute malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72, 378-385.

- Greenwood, B.M., and Vick, R.M. (1975). Evidence for a malaria mitogen in human malaria. *Nature* 257, 592-594.
- Helmby, H., Jonsson, G., and Troye-Blomberg, M. (2000). Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 68, 1485-1490.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Hunt, N.H., and Grau, G.E. (2003). Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24, 491-499.
- Ing, R., and Stevenson, M.M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infect Immun* 77, 770-782.
- Jacobs, P., Radzioch, D., and Stevenson, M.M. (1996). A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 64, 535-541.
- Kai, O.K., and Roberts, D.J. (2008). The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? *BMC Med* 6, 24.
- Kappe, S.H., Kaiser, K., and Matuschewski, K. (2003). The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol* 19, 135-143.
- Keller, C.C., Yamo, O., Ouma, C., Ong'echa, J.M., Ounah, D., Hittner, J.B., Vulule, J.M., and Perkins, D.J. (2006). Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun* 74, 5249-5260.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8, 223-246.
- Kierzenbaum, F., ed. (1993). *PARASITIC INFECTIONS AND THE IMMUNE SYSTEM* (Michigan State University, East Lansing, U.S.A.: Academic Press).
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., and Kuby, J. (2007). *Kuby immunology*, 6th edn (New York: W.H. Freeman).
- Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., and Debatin, K.M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6, 279-289.
- Krieg, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Kumar, S., Epstein, J.E., and Richie, T.L. (2002). Vaccines against asexual stage malaria parasites. *Chem Immunol* 80, 262-286.
- Lamb, T.J., Brown, D.E., Potocnik, A.J., and Langhorne, J. (2006). Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8, 1-22.
- Lee, K.S., Sen, G., and Snapper, C.M. (2005). Endogenous CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells play no apparent role in the acute humoral response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 73, 4427-4431.

- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197, 1467-1476.
- Lim, H.W., Hillsamer, P., Banham, A.H., and Kim, C.H. (2005). Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 175, 4180-4183.
- Lima, M.R., Bandeira, A., Falanga, P., Freitas, A.A., Kipnis, T.L., da Silva, L.P., and Coutinho, A. (1991). Clonal analysis of B lymphocyte responses to *Plasmodium chabaudi* infection of normal and immunoprotected mice. *Int Immunol* 3, 1207-1216.
- Long, G.H., Chan, B.H., Allen, J.E., Read, A.F., and Graham, A.L. (2008). Blockade of TNF receptor 1 reduces disease severity but increases parasite transmission during *Plasmodium chabaudi chabaudi* infection. *Int J Parasitol* 38, 1073-1081.
- Luty, A.J., Lell, B., Schmidt-Ott, R., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbig, K., Schmid, D., Migot-Nabias, F., *et al.* (1999). Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis* 179, 980-988.
- Mabey, D.C., Brown, A., and Greenwood, B.M. (1987). *Plasmodium falciparum* malaria and *Salmonella* infections in Gambian children. *J Infect Dis* 155, 1319-1321.
- Malaguarnera, L., and Musumeci, S. (2002). The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 2, 472-478.
- Martiney, J.A., Sherry, B., Metz, C.N., Espinoza, M., Ferrer, A.S., Calandra, T., Broxmeyer, H.E., and Bucala, R. (2000). Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun* 68, 2259-2267.
- McDevitt, M.A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V.R., Metz, C.N., Mitchell, R., *et al.* (2006). A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *J Exp Med* 203, 1185-1196.
- Medicine, R.L. (September 2003 1998-2003, posting date). MALARIA-An On-line resource. The Division of Laboratory Medicine at Royal Perth Hospital.
- Meding, S.J., and Langhorne, J. (1991). CD4⁺ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Eur J Immunol* 21, 1433-1438.
- Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., and Doumbo, O.K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679.
- Miller, L.H., Good, M.F., and Milon, G. (1994). Malaria pathogenesis. *Science* 264, 1878-1883.
- Millington, O.R., Di Lorenzo, C., Phillips, R.S., Garside, P., and Brewer, J.M. (2006). Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J Biol* 5, 5.
- Montes, C.L., Acosta-Rodriguez, E.V., Merino, M.C., Bermejo, D.A., and Gruppi, A. (2007). Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? *J Leukoc Biol* 82, 1027-1032.
- Morand, E.F., Leech, M., and Bernhagen, J. (2006). MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 5, 399-410.

- Najera, J.A. (2001). Malaria control: achievements, problems and strategies. *Parassitologia* 43, 1-89.
- Nardin, E.H., and Nussenzweig, R.S. (1993). T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol* 11, 687-727.
- Oldenhove, G., de Heusch, M., Urbain-Vansanten, G., Urbain, J., Maliszewski, C., Leo, O., and Moser, M. (2003). CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198, 259-266.
- Orjih, A.U., and Nussenzweig, R.S. (1979). *Plasmodium berghei*: suppression of antibody response to sporozoite stage by acute blood stage infection. *Clin Exp Immunol* 38, 1-8.
- Pancake, S.J., Holt, G.D., Mellouk, S., and Hoffman, S.L. (1992). Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol* 117, 1351-1357.
- Paxton, L.A., Slutsker, L., Schultz, L.J., Luby, S.P., Meriwether, R., Matson, P., and Sulzer, A.J. (1996). Imported malaria in Montagnard refugees settling in North Carolina: implications for prevention and control. *Am J Trop Med Hyg* 54, 54-57.
- Plebanski, M., and Hill, A.V. (2000). The immunology of malaria infection. *Curr Opin Immunol* 12, 437-441.
- Podoba, J.E., and Stevenson, M.M. (1991). CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS. *Infect Immun* 59, 51-58.
- Reina-San-Martin, B., Cosson, A., and Minoprio, P. (2000). Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today* 16, 62-67.
- Sardinha, L.R., D'Imperio Lima, M.R., and Alvarez, J.M. (2002). Influence of the polyclonal activation induced by *Plasmodium chabaudi* on ongoing OVA-specific B- and T-cell responses. *Scand J Immunol* 56, 408-416.
- Sauerwein, R.W. (2009). Clinical malaria vaccine development. *Immunol Lett* 122, 115-117.
- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R., and Nussenzweig, V. (1987). Gamma interferon, CD8⁺ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature* 330, 664-666.
- Scorza, T., Magez, S., Brys, L., and De Baetselier, P. (1999). Hemozoin is a key factor in the induction of malaria-associated immunosuppression. *Parasite Immunol* 21, 545-554.
- Snow, R.W., Craig, M.H., Deichmann, U., and le Sueur, D. (1999). A preliminary continental risk map for malaria mortality among African children. *Parasitol Today* 15, 99-104.
- Starlets, D., Gore, Y., Binsky, I., Haran, M., Harpaz, N., Shvidel, L., Becker-Herman, S., Berrebi, A., and Shachar, I. (2006). Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107, 4807-4816.
- Stephens, R., and Langhorne, J. (2006). Priming of CD4⁺ T cells and development of CD4⁺ T cell memory; lessons for malaria. *Parasite Immunol* 28, 25-30.
- Stevenson, M.M., and Riley, E.M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 4, 169-180.
- Stevenson, M.M., and Skamene, E. (1986). Modulation of primary antibody responses to sheep erythrocytes in *Plasmodium chabaudi*-infected resistant and susceptible mouse strains. *Infect Immun* 54, 600-602.

- Stevenson, M.M., and Urban, B.C. (2006). Antigen presentation and dendritic cell biology in malaria. *Parasite Immunol* 28, 5-14.
- Stevenson, M.M., and Zavala, F. (2006). Immunology of malaria infections. *Parasite Immunol* 28, 1-4.
- Steward, M.W., and Voller, A. (1973). The effect of malaria on the relative affinity of mouse antiprotein antibody. *Br J Exp Pathol* 54, 198-202.
- Su, Z., and Stevenson, M.M. (2002). IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *J Immunol* 168, 1348-1355.
- Taylor-Robinson, A.W. (1997). Inhibition of IL-2 production by nitric oxide: a novel self-regulatory mechanism for Th1 cell proliferation. *Immunol Cell Biol* 75, 167-175.
- Taylor-Robinson, A.W., and Phillips, R.S. (1994). Th1 and Th2 CD4+ T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for an unrelated antigen protect against blood stage *P. chabaudi* infection. *Eur J Immunol* 24, 158-164.
- Thiele, M., and Bernhagen, J. (2005). Link between macrophage migration inhibitory factor and cellular redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 7, 1234-1248.
- Troye-Blomberg, M. (2002). Genetic regulation of malaria infection in humans. *Chem Immunol* 80, 243-252.
- Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., and Nathan, C. (1988). Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334, 260-262.
- Tzianetas, I., Habal, F., and Keystone, J.S. (1996). Short report: severe hiccups secondary to doxycycline-induced esophagitis during treatment of malaria. *Am J Trop Med Hyg* 54, 203-204.
- Urban, B.C., and Todryk, S. (2006). Malaria pigment paralyzes dendritic cells. *J Biol* 5, 4.
- Weidanz, W.P. (1982). Malaria and alterations in immune reactivity. *Br Med Bull* 38, 167-172.
- Weiss, W.R., Mellouk, S., Houghten, R.A., Sedegah, M., Kumar, S., Good, M.F., Berzofsky, J.A., Miller, L.H., and Hoffman, S.L. (1990). Cytotoxic T cells recognize a peptide from the circumsporozoite protein on malaria-infected hepatocytes. *J Exp Med* 171, 763-773.
- Wellems, T.E., and Miller, L.H. (2003). Two worlds of malaria. *N Engl J Med* 349, 1496-1498.
- White, N.J., and Ho, M. (1992). The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol* 31, 83-173.
- Whittle, H.C., Brown, J., Marsh, K., Blackman, M., Jobe, O., and Shenton, F. (1990). The effects of *Plasmodium falciparum* malaria on immune control of B lymphocytes in Gambian children. *Clin Exp Immunol* 80, 213-218.
- Whittle, H.C., Brown, J., Marsh, K., Greenwood, B.M., Seidelin, P., Tighe, H., and Wedderburn, L. (1984). T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B cells is lost during *P. falciparum* malaria. *Nature* 312, 449-450.
- Williamson, W.A., and Greenwood, B.M. (1978). Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. *Lancet* 1, 1328-1329.
- Wipasa, J., Elliott, S., Xu, H., and Good, M.F. (2002). Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches. *Immunol Cell Biol* 80, 401-414.
- Wykes, M.N., Zhou, Y.H., Liu, X.Q., and Good, M.F. (2005). *Plasmodium yoelii* can ablate vaccine-induced long-term protection in mice. *J Immunol* 175, 2510-2516.

- Yap, G.S., and Stevenson, M.M. (1991). Production of soluble inhibitor of erythropoiesis during *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Ann N Y Acad Sci* 628, 279-281.
- Yap, G.S., and Stevenson, M.M. (1994). Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in *Plasmodium chabaudi* AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. *Infect Immun* 62, 357-362.
- Yasasever, V., Camlica, H., Duranyildiz, D., Oguz, H., Tas, F., and Dalay, N. (2007). Macrophage migration inhibitory factor in cancer. *Cancer Invest* 25, 715-719.
- Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J.C., and Ortiz-Ortiz, L. (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 18, 272-278.
- Zhu, X., Meng, G., Dickinson, B.L., Li, X., Mizoguchi, E., Miao, L., Wang, Y., Robert, C., Wu, B., Smith, P.D., *et al.* (2001). MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166, 3266-3276.